



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Cirugía

INFLUENCIA DEL APORTE DE CÉLULAS
TRONCALES MESENQUIMALES DERIVADAS DEL
TEJIDO ADIPOSO EN LA REPARACIÓN DEL
MANGUITO ROTADOR:
MODELO EXPERIMENTAL EN RATA

TESIS DOCTORAL

MARIA VALENCIA MORA

2014



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Cirugía

INFLUENCIA DEL APORTE DE CÉLULAS
TRONCALES MESENQUIMALES DERIVADAS DEL
TEJIDO ADIPOSO EN LA REPARACIÓN DEL
MANGUITO ROTADOR:
MODELO EXPERIMENTAL EN RATA

TESIS DOCTORAL

MARIA VALENCIA MORA

DIRECTORES

RAÚL BARCO LAAKSO

MARIANO GARCÍA ARRANZ

2014

“But that’s not the point. The point is whether or not I improved over yesterday. In long-distance running the only opponent you have to beat is yourself, the way you used to be.”

Haruki Murakami
What I Talk About When I Talk About Running

Nota de Agradecimiento

Hoy sé que el arte de la medicina y la cirugía es un proceso continuo de aprender y enseñar en el que cada detalle y cada persona es importante. En esto, no es diferente de la vida en sí misma. Por eso, en primer lugar querría dar las gracias a mis padres, Ramón y Esperanza y a mi hermano Ramón, a quienes debo lo que soy. Gracias a los sacrificios que ellos han hecho hoy estoy aquí, gracias a la capacidad de trabajo que me han transmitido, a su templanza, a su ejemplo.

Creo firmemente que la clave del éxito profesional se encuentra en la pasión que uno siente por su trabajo. Por eso, cuando alguien me pregunta de dónde surge mi interés por la cirugía de hombro y codo, la respuesta es sencilla. A lo largo de estos años de carrera profesional he tenido la suerte de trabajar con cirujanos que representan para mí la excelencia en lo asistencial y en lo académico. Ellos me han enseñado a valorar la importancia de la investigación para progresar y poder ofrecer mejores soluciones a nuestros pacientes. Gracias a Raúl Barco y a Samuel Antuña, por el estímulo y por el consejo. Gracias a Enrique Gil Garay por su ayuda todos estos años. Gracias a Guido Marra y a Leesa M. Galatz, por su generosidad y por inspirar grandes partes de esta tesis. Gracias a Emilio Calvo y a Antonio Foruria por abrirme las puertas de su quirófano y ayudarme a mantener la ilusión. Gracias a Carlos Cobiella por la paciencia infinita y por la música.

Gracias también a Mariano García-Arranz y a todo el personal del laboratorio de terapia celular, por estar siempre dispuestos a ayudar y a M. Teresa Carrascal por su gran entusiasmo. Gracias a José Ramón Ramírez por su contribución con la anatomía patológica y a Jesús Díez Sebastián por su gran aportación en la interpretación de los resultados estadísticos.

Por último, gracias a Luis, mi marido, que me hace ser mejor cada día.

Índice

Índice

I. Estado actual del tema

1. El manguito rotador

1.1 Anatomía de los componentes del manguito rotador

1.2 Función y biomecánica del manguito rotador

1.3 Roturas del manguito rotador

1.3.1 Fisiopatología de las roturas del manguito rotador

1.3.2 Clasificación de las roturas del manguito rotador

1.3.3 Epidemiología de las roturas del manguito rotador

1.3.4 Tratamiento de las roturas del manguito rotador

1.3.5 Resultados del tratamiento de las roturas del manguito rotador

2. La entesis: Cicatrización Hueso-Tendón

2.1 La entesis

2.2 El desarrollo de la entesis

2.3 Biología de la reparación de la entesis

3. Aplicación clínica de la biología a la reparación del manguito rotador

3.1 Componentes celulares

3.2 Componentes extracelulares

3.3 Inhibidores de metaloproteasas

3.4 Factores de crecimiento

3.5 Plasma rico en plaquetas (PRP) o gel de plaquetas

- 3.6 Terapia génica
- 3.7 Factores de transcripción
- 3.8 Terapia celular

4. Terapia Celular

- 4.1 Definición de célula troncal
- 4.2 Definición de terapia celular
- 4.3 Células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo
- 4.4 Aplicación clínica de la terapia celular
- 4.5 Terapia celular en la reparación del manguito rotador

II. Hipótesis y Objetivos del Trabajo

III. Material y Método

1. Animal de experimentación y agrupamiento

2. Técnica quirúrgica

- 2.1 Material para la cirugía
- 2.2 Método de obtención y expansión de las células troncales
mesenquimales derivadas del tejido adiposo
- 2.3 Soporte de colágeno
- 2.4 Procedimiento quirúrgico

3. Modelo experimental

3.1 Estudio Biomecánico

3.1.1 Sacrificio y preparación de las muestras

3.1.2 Máquina de ensayos

3.1.3 Variables de medida de los parámetros biomecánicos

3.1.4 Realización de los ensayos

3.2 Estudio Histológico

3.2.1 Sacrificio y preparación de las muestras

3.2.2 Variables de medida

4. Análisis estadístico

IV. Resultados

1. Complicaciones

2. Resultados del estudio biomecánico

2.1 Estudio comparativo entre grupo control y grupo experimental

a. Sacrificio a las dos semanas

b. Sacrificio a las cuatro semanas

2.2 Estudio comparativo intragrupo para ambos tiempos de sacrificio

3. Resultados del estudio histológico

3.1 Observaciones groseras

3.2 Inmunofluorescencia

3.3 Análisis histológico intergrupar

- a. Muestras obtenidas a las 24 horas de la cirugía
- b. Muestras obtenidas a la semana de la cirugía
- c. Muestras obtenidas a las 4 semanas de la cirugía

3.4 Análisis histológico intragrupal

V. Discusión

1. Limitaciones del estudio

2. El animal de experimentación

3. El modelo experimental

4. Utilización de las CMDL: Bioseguridad

5. Nuestra hipótesis: Interpretación de los resultados

VI. Conclusiones

VII. Resumen

VII. Bibliografía

Listado de Abreviaturas

ASC (del inglés, *Adipose Tissue Derived Stem Cells*): Células troncales derivadas del tejido adiposo.

BMP (del inglés, *Bone Morphoprotein*): Proteína morfogenética ósea.

BM-MSC (del inglés, *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*): Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.

CMDL: Células troncales mesenquimales derivadas del tejido lipídico.

EICH: Enfermedad injerto contra huésped.

bFGF (del inglés, *Fibroblast Growth Factor*): Factor básico de crecimiento fibroblástico.

GDF (del inglés, *Growth Differentiation Factor*): Factor de crecimiento diferenciador.

IGF (del inglés, *Insuline Growth factor*): Factor de crecimiento derivado de insulina.

J: Julio (unidad del sistema internacional de medida).

IL: Interleuquina.

LAC: Lipoaspirado asistido por células.

Mm: milímetros(unidad del sistema internacional de medida).

MMP (del inglés, *Matrix Metalloprotease*): Metaloproteasa.

MSC (del inglés, *Mesenchymal Stem Cell*): Células troncales mesenquimales.

N: Newton (unidad del sistema internacional de medida).

ODN (del inglés, *Non coding oligonucleotide*): Oligonucleótido sin sentido o no codificante.

PRP(del inglés, *Platelet Rich Plasma*): Plasma rico en plaquetas.

PBS (del inglés, *Buffered Phosphate Solution*): Solución tampón salino fosfato.

PTHrP (del inglés, *Paratohormone Related Protein*): Proteína relacionada con la Paratohormona.

PDGFb (del inglés, *Platelet derived growth factor b*): Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

RNA (del inglés, *Ribonucleic acid*): Ácido ribonucleico.

SMCS (del inglés, *Synovial Mesenchymal Stem Cells*): Células troncales mesenquimales derivadas de sinoviocitos.

SVF (del inglés, *Stromal Vascular Fraction*): Fracción vasculo stromal.

TGF- β 3 (del inglés, *Transforming Growth factor β 3*): Factor transformante β 3.

TGF- β 1 (del inglés, *Transforming Growth factor β 1*): Factor transformante β 1.

TIMP-1 (del inglés, *Tisular inhibitor of Metaloproteases*): Factor tisular inhibidor de metaloproteasas.

TNF α (del inglés, *Tumoral necrotic factor Alfa*): Factor de necrosis tumoral alfa.

TSPC (del inglés, *tenocyte derived stem cells*): Células troncales mesenquimales derivadas de tenocitos.

I. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

I. Estado Actual del tema

Las lesiones del manguito rotador son una de las principales causas de dolor y disfunción del miembro superior¹. El concepto de compromiso del espacio subacromial y su correlación con la patología del manguito rotador fue descrito por primera vez por Neer en 1972². En las últimas décadas el interés por la cirugía de hombro, en concreto la cirugía artroscópica, ha crecido considerablemente. Sin embargo, las lesiones del manguito rotador siguen siendo el gran reto quirúrgico, ya que aunque los resultados clínicos de la reparación de este tipo de lesiones son generalmente satisfactorios, en muchos casos no se consigue la cicatrización del tendón³. Por ello, sigue existiendo controversia en cuanto a las diferentes modalidades de tratamiento con el objetivo de favorecer la cicatrización de la reparación.

1. El manguito rotador

1.1 Anatomía de los componentes del manguito rotador

El hombro es un complejo conjunto de estructuras que consta de tres huesos principales, húmero, escápula y clavícula, y tres articulaciones, glenohumeral, acromioclavicular y escapulotorácica, que están interconectadas por medio de ligamentos y músculos (Figura 1). La articulación glenohumeral es inherentemente inestable debido a su estructura ósea lo que a su vez le permite un gran rango de movilidad. Por ello, las partes blandas que rodean a la articulación son las responsables de garantizar la estabilidad de la misma. El manguito rotador controla los movimientos de abducción, elevación, rotación interna y rotación externa y constituye uno de los principales estabilizadores dinámicos junto con la porción larga

del músculo bíceps, la articulación escapulotorácica y el resto de músculos periarticulares como el pectoral mayor, el serrato anterior y el dorsal ancho ⁴.

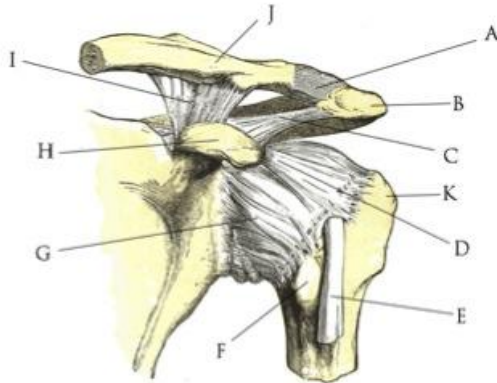


Figura 1. Imagen que representa de forma esquemática un hombro izquierdo desde una visión anterior. A) Ligamento acromioclavicular; B) Acromion; C) Ligamento coracoacromial; D) Cápsula articular porción superior; E) Tendón de la porción larga del Bíceps; F) Tuberosidad menor; G) Cápsula articular, porción anterior; H) Coracoides; I) Ligamentos coracoclaviculares; J) Clavícula; K) Tuberosidad mayor (Drake R y cols. *Gray's Atlas of Anatomy*. Elsevier. 2008)



Figura 2. Ilustraciones anatómicas de la región del hombro, incluyendo los músculos del manguito rotador y algunos de los músculos periarticulares referidos anteriormente, desde una visión anterior y posterior (Drake R y cols. *Gray's Atlas of Anatomy*. Elsevier. 2008).

El manguito rotador está compuesto por cuatro músculos: el subescapular, el supraespinoso, el infraespinoso y el redondo menor (Figura 2). Estos músculos terminan en unos tendones planos, cortos y anchos que se fusionan con la cápsula fibrosa de la articulación glenohumeral. Numerosos estudios han determinado sus

principales características histológicas y anatómicas. Clark y Harryman⁵ describieron con detalle la estructura del manguito rotador y su estrecha relación con la cápsula articular. En un estudio en cadáveres observaron que los tendones se fusionan muy cerca de su inserción en la tuberosidad, dando lugar a una estructura anatómica común con un grosor medio de 9 a 12 mm. Los tendones del supraespinoso y del infraespinoso se unen a 15 mm de su inserción en el troquíter y no es posible separarlos mediante disección roma. Este fenómeno también se observa entre el infraespinoso y el redondo menor, a pesar de que existe un intervalo anatómico entre ambos músculos. Existe también una zona de separación entre el supraespinoso y el subescapular que se denomina intervalo rotador, en el que se encuentran el ligamento coracohumeral y el ligamento glenohumeral superior. El tendón de la porción larga del bíceps atraviesa la cápsula glenohumeral a través de este intervalo para hacerse intrarticular (Figura 3).

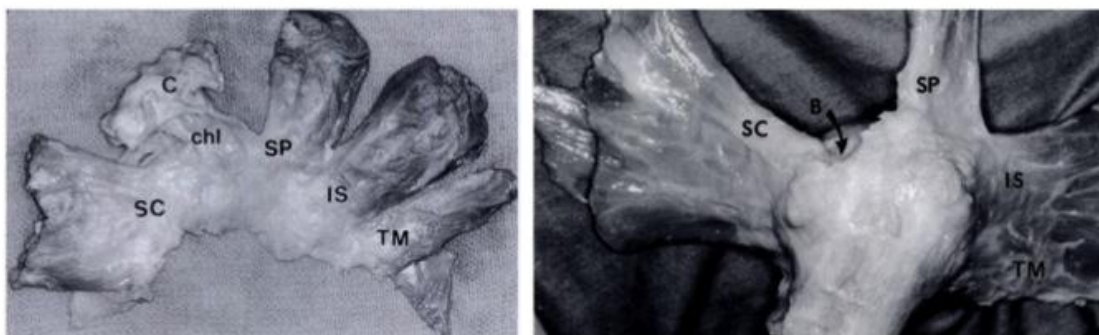


Figura 3. A) Imagen correspondiente a unidad la miotendinosa del manguito rotador tras su desinserción del húmero. B) Imagen que muestra la confluencia de los tendones supraespinoso e infraespinoso en su inserción a 1,5 cm de la tuberosidad mayor, la interdigitación de supraespinoso y subescapular y el espacio correspondiente para el tendón de la porción larga del bíceps. SC: Subescapular, chl: ligamento coracohumeral, C: fragmento osteotomizado de coracoides, B: Bíceps, SP: supraespinoso; IS: infraespinoso; TM: redondo menor. (Clark JM, Harryman DT. *J Bone Joint Surg Am.* 1992;74:713-725).

Los tendones del manguito rotador están reforzados en su inserción por estructuras fibrosas tanto superficiales como profundas. La porción más superficial del

infraespinoso y del supraespinoso se encuentra reforzada por una gruesa capa fibrosa que contacta con la parte más profunda de la bursa subdeltoidea sin formar parte de la misma. El ligamento coracohumeral es una estructura fibrosa y gruesa, de 1 cm de anchura aproximadamente, que se extiende desde el borde lateral de la apófisis coracoides y se inserta en el húmero. Consta de dos haces, el anterior y el posterior. Este último llega hasta el infraespinoso, constituyendo un engrosamiento de la cápsula en dirección perpendicular a las fibras tendinosas. El haz anterior del ligamento coracohumeral y la cápsula también forman parte del techo de la corredera bicipital en el intervalo entre los tendones del supraespinoso y el subescapular.

El músculo subescapular es la mayor estructura musculotendinosa del manguito rotador y se origina en la fosa subescapular, en la porción anterior de la escápula. Sus fibras se unen a la cápsula justo en la región lateral del reborde glenoideo y se insertan en la tuberosidad menor, medial a la corredera bicipital, en una zona de 40 mm de longitud y 20 mm de anchura. Esto da lugar a una forma triangular, de tal manera que la parte superior del músculo, tendinosa, se inserta en un área mayor que la parte inferior que es en su mayoría muscular⁶. Algunas de estas fibras se insertan directamente en la diáfisis humeral inmediatamente distal a la inserción tendinosa. El volumen y fuerza de este músculo son suficientes para contrarrestar la fuerza ejercida por el infraespinoso y el redondo menor en la región posterior. Está innervado por el nervio subescapular.

El músculo infraespinoso es el segundo en tamaño. Se origina en la fosa infraespinosa en la región posterior de la escápula, y su tendón, tras fusionarse con la cápsula fibrosa y rodear la parte posterior del supraespinoso, se inserta en el troquíter. La huella del infraespinoso es trapezoidal y mide 10,2 mm en dirección medio-lateral y 32,7mm en dirección anteroposterior⁷. Su inserción se aleja de la superficie articular

de proximal a distal, de 0 a 18 mm. Esta distancia entre la superficie articular y la inserción distal constituye la denominada “área desnuda”. Está estrechamente relacionado estructural y funcionalmente con el redondo menor. Está innervado por el nervio supraescapular (Figura 4).

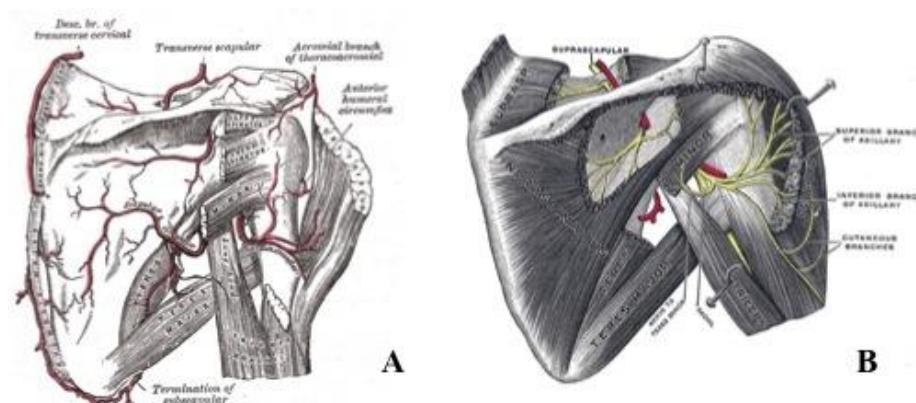


Figura 4. Ilustraciones anatómicas de la región del hombro. A) Vascularización de los músculos del manguito rotador y periarticulares. B) Inervación de los músculos del manguito rotador. Pueden apreciarse el nervio y la arteria supraescapular a su paso por el hiato espinoescapular (*Drake R y cols. Gray's Atlas of Anatomy. Elsevier. 2008*)

El redondo menor se origina en el borde axilar de la escápula y se inserta en la región más distal del troquíter. Es la unidad músculo tendinosa más pequeña con una inserción triangular de 29 mm de longitud y 21 de anchura⁸. Al igual que en el subescapular, algunas de sus fibras se insertan directamente en el húmero hasta 2 cm por debajo de la inserción tendinosa. Está innervado por la rama posterior del nervio axilar⁹ (Figura 5).

El músculo supraespinoso es el tercero en tamaño y también está innervado por el nervio supraescapular. Se origina en la fosa supraespinosa y su tendón se inserta en la parte más anterior y proximal en la tuberosidad mayor, detrás de la corredera bicipital. Las dimensiones medias de la zona de inserción del supraespinoso siguen siendo objeto de controversia. Dugas y cols. en un estudio en cadáver determinaron

que la longitud media en dirección medio-lateral era de 12,7 mm y la anchura antero-posterior de 16,3 mm⁶. Otros autores sin embargo han encontrado valores mayores, siendo 23 mm y 16 mm respectivamente⁸ y también menores, como Mochizuki y cols, que publicaron una longitud mediolateral de 6,9 mm y anteroposterior de 12,6 mm⁷.

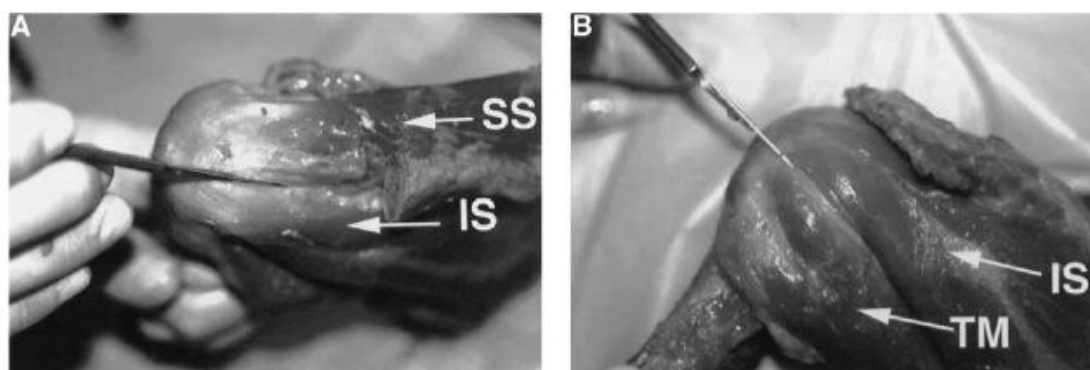


Figura 5. Imagen correspondiente a los intervalos musculares del manguito rotador en un cadáver. **A)** Intervalo entre supraespinoso e infraespinoso. **B)** Intervalo entre infraespinoso y redondo menor. SS: supraespinoso; IS: infraespinoso; TM: redondo menor. (*Dugas JR et al; J Shoulder Elbow Surg. 2002;11:498-503*).

La anatomía de la región exacta donde se inserta el manguito rotador, que se denomina también “huella anatómica”⁶. Ha sido ampliamente estudiada y su área total media, incluyendo los tres tendones, es de aproximadamente 6cm². En cuanto a sus dimensiones, Dugas⁶ y Ruotolo¹⁰ demostraron que la inserción medio-lateral del manguito promediaba los 14,7 mm y 12,1 mm respectivamente. El primer autor, en un estudio en cadáver⁶, demostró que la distancia desde el margen articular hasta las fibras más mediales del manguito rotador eran de menos de 1mm en la parte más anterior de la inserción del manguito en la tuberosidad. No pudieron establecer una relación estadísticamente significativa entre las dimensiones del manguito rotador y el tamaño de la cabeza humeral. Estudios anatómicos más recientes han revelado que existe una compleja relación entre ambos tendones en su inserción en la tuberosidad mayor¹¹. El área correspondiente al tendón del supraespinoso es considerablemente

menor que la del infraespinoso, siendo $1,55 \text{ cm}^2$ y $1,76 \text{ cm}^2$ respectivamente, siendo el área correspondiente al redondo menor la de mayor proporción, ocupando $2,2 \text{ cm}^2$. En estudios anatómicos en cadáver más recientes, Mochizuki y cols.¹² encontraron que la huella del tendón supraespinoso era mucho más pequeña que la del infraespinoso, de tal manera que éste ocupaba la mayor parte de la tuberosidad mayor del húmero. En el 21% de sus especímenes, el supraespinoso tenía una larga porción tendinosa que era intramuscular y se encontraba en la parte más anterior del músculo, siendo ésta la que se insertaba de forma constante en la parte más proximal del troquíter. El infraespinoso también tenía una porción tendinosa en la mitad superior del músculo que se curvaba anteriormente y se extendía a la porción anterolateral de la parte más superior de la huella en la tuberosidad. Esta superposición de ambos tendones también fue constatada por Curtis y cols.⁸, que describieron que el infraespinoso bordeaba superiormente al supraespinoso cerca de la superficie articular.

Histológicamente, el complejo manguito rotador-cápsula está formado por 5 capas en la zona correspondiente al infraespinoso y supraespinoso⁵. La capa más superficial corresponde a fibras del ligamento coracohumeral que se fusionan en la región lateral con el periostio humeral. Es una capa ampliamente vascularizada mediante arteriolas. La segunda capa corresponde a gruesos haces de fibras tendinosas paralelos entre sí. La tercera capa está compuesta por haces fibrosos menos compactos con una disposición oblicua 45° con respecto a las anteriores. En esta capa se produce la interdigitación entre supraespinoso, infraespinoso y subescapular. La cuarta capa estaría constituida por la expansión profunda del ligamento coracohumeral y la quinta capa, la más profunda, correspondería a la cápsula articular (Figura 6).

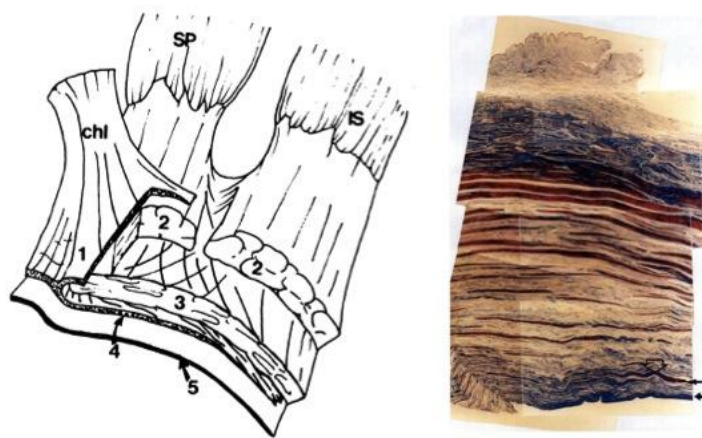


Figura 6. Imagen esquemática de las 5 capas del complejo manguito rotador-cápsula y su equivalente histológico; chl: ligamento coracohumeral, SP: supraespinoso; IS: infraespinoso. (Clark JM, Harryman DT. *J Bone Joint Surg Am.* 1992;74:713-725).

Numerosos autores han estudiado la anatomía vascular del manguito rotador y la posible existencia de una región hipovascular en el tendón supraespinoso que podría condicionar la aparición de patología en el manguito rotador¹³. El mayor aporte vascular arterial del manguito rotador proviene de la rama ascendente de la arteria circunfleja humeral anterior, la rama acromial de la arteria toracoacromial, así como de la arteria supraescapular y la arteria circunfleja humeral posterior¹⁴. Rothman y Parke¹⁵ describieron que el 76% de la vascularización la proporcionaba la arteria toracoacromial. En su estudio también apreciaron una zona de hipovascularización cerca de la inserción del tendón supraespinoso, que era mayor en la zona más profunda, correspondiendo a la superficie articular. Clark y Harryman⁵ demostraron también que el número de vasos y su tamaño decrecía de medial a lateral y que las arteriolas eran mayores y más prevalentes en la superficie bursal del manguito rotador que en la articular. Es cierto que la mayoría de los estudios en cadáver han sugerido la existencia de esta área denominada crítica, sin embargo, otros autores ponen en duda la existencia de dicha zona y lo han relacionado con la degeneración tendinosa que ocurre con la edad. Nixon y DiStefano¹⁶ indicaron que esta zona podría corresponder a la anastomosis entre los vasos óseos y los musculares y Chansky y cols.¹⁴ confirmaron la presencia de hipervascularización en la región crítica en pacientes con síndrome subacromial sintomático.

El arco coracoacromial y el espacio subacromial

El arco coracoacromial es la superficie lisa cóncava inferior formada por la cara anterior e inferior del acromion, la apófisis coracoides y el ligamento coracoacromial. Constituye el techo de la articulación glenohumeral y entre este arco y la cabeza humeral encontramos el denominado espacio subacromial, por el que deben deslizarse los tendones del manguito rotador en todos los movimientos de la articulación. Este proceso de deslizamiento está favorecido por la bolsa subacromial-subdeltoidea y por el líquido sinovial. En condiciones normales el espacio subacromial es un espacio virtual, es decir, cualquier traslación superior comprime el manguito entre la cabeza humeral y el arco coracoacromial. A este desplazamiento humeral superior se contrapone una fuerza descendente que ejerce el arco, a través del manguito, sobre la cabeza humeral (Figura 7).

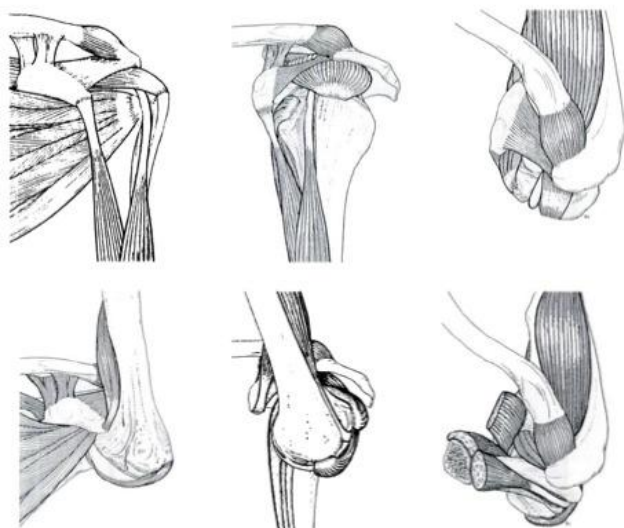


Figura 7. Ilustración del espacio subacromial y sus diferentes elementos. La secuencia superior representa la relación de las mencionadas estructuras en posición neutra y la secuencia inferior en posición de elevación máxima desde una vista anterior, lateral y superior respectivamente (Watson *M. J Bone Joint Surg Br.* 1989;71-B:361-6).

1.2 Función y biomecánica del manguito rotador

La biomecánica de la articulación glenohumeral es compleja¹⁷. El deltoides y los músculos del manguito trabajan de forma sinérgica para mantener un par de fuerzas equilibrado en el plano coronal y en el plano axial. Otros músculos como el pectoral mayor, el dorsal ancho, el redondo mayor, el bíceps braquial y los músculos escapulo-torácicos también son estabilizadores activos de la articulación. La porción del deltoides y los músculos del manguito que se insertan inferiormente al ecuador de la cabeza humeral mantienen el equilibrio en el plano coronal, mientras que el subescapular, el infraespinoso y el redondo menor lo mantienen en el plano axial contrarrestando sus pares de fuerzas. Mediante este mecanismo, el manguito rotador constituye un estabilizador primario fundamental para mantener una reducción concéntrica de la cabeza humeral en la glenoides durante el movimiento de rotación. El supraespinoso inicia el movimiento de abducción pero se mantiene activo durante todo el rango de movimiento. El infraespinoso y el redondo menor son ambos rotadores externos. Mientras que el infraespinoso es más activo en posición neutral con el brazo al lado del cuerpo, el redondo menor lo es con el brazo en 90° de abducción. Como se mencionó anteriormente, el subescapular es principalmente rotador interno. El deltoides, por su parte, es el principal elevador del hombro cuando el supraespinoso no es funcionante. Consta de 3 partes: anterior, media y posterior y la mayor o menor actividad de cada una de ellas depende de la dirección de movimiento del brazo. Los estabilizadores pasivos están constituidos por la propia geometría glenoidea, el arco coracoacromial, el labrum glenoideo, los ligamentos glenohumerales y el ligamento coracohumeral. Los músculos del manguito rotador comprimen la cabeza humeral contra la superficie cóncava de la glenoides y el labrum permitiendo la rotación concéntrica de la cabeza humeral¹⁸. El manguito rotador es

responsable del 45% de la fuerza en abducción y del 90% de la fuerza en rotación externa¹⁹.

Las fibras tendinosas están sometidas a un conjunto de fuerzas también complejo. Existen fuerzas de tensión concéntrica cuando el húmero se desplaza de forma activa en la dirección de la acción del músculo del manguito. Existen fuerzas de tensión excéntrica al resistir el desplazamiento humeral en direcciones contrarias a la de la acción de los músculos del manguito. Las fibras tendinosas también soportan momentos de flexión cuando la cabeza humeral rota en relación con la escápula y fuerzas de compresión cuando el tendón es comprimido entre la cabeza humeral y el arco subacromial al aplicar cargas de orientación superior. Se ha calculado que en las actividades normales la fuerza transmitida a través del tendón es de 140 N a 200 N²⁰.

1.3 Roturas del manguito rotador

1.3.1 Fisiopatología de las roturas del manguito rotador

El espectro de condiciones patológicas descritas en el manguito rotador es amplio. El concepto de compromiso del espacio subacromial (*impingement*) fue descrito por primera vez por Neer en 1972². Este síndrome fue descrito como un compromiso mecánico de los tendones del manguito rotador bajo la porción antero-inferior del acromion que ocurría cuando el hombro se situaba en flexión anterior y rotación interna y consta de tres fases.

La primera, que se observaba en pacientes menores de 25 años, consistía en inflamación aguda, hemorragia y edema en el manguito rotador. Esta etapa sería reversible con tratamiento conservador. La segunda fase se observaba en pacientes entre 25 y 40 años y representaba la evolución de esa fase de hemorragia y edema a fibrosis y tendinitis del manguito rotador. Esta fase podría no responder a tratamiento

conservador y requerir cirugía. La tercera fase se caracterizaba por disrupción mecánica de los tendones del manguito rotador y cambios en el arco coracoacromial con osteofitos en la parte anterior del acromion. Suelen apreciarse alteraciones radiográficas como lesiones quísticas en el troquíter, esclerosis en la superficie anterior del acromion, osteofitos, osificación del ligamento coracoacromial, cambios en la articulación acromioclavicular y estrechamiento del espacio subacromial. Esta fase afecta normalmente a pacientes mayores de 40 años y suele requerir cirugía. Neer creía firmemente que la causa de la degeneración y consecuente rotura del manguito rotador era el compromiso que existía bajo el arco coracoacromial, que era rígido. Por eso proponía como tratamiento la realización de acromioplastia asociada a la reparación del manguito rotador. Desde entonces, aunque muchos factores se han relacionado con la patología del manguito rotador, la fisiopatología de la misma, así como su historia natural y progresión, sigue siendo objeto de controversia²¹. Tradicionalmente se describieron dos grandes teorías. En primer lugar, la teoría de los factores extrínsecos, que son los relacionados con el compromiso que se produce en el arco subacromial y la articulación acromioclavicular, ya descrita previamente por Neer²². Bigliani describió diferentes tipos de acromion, plano, curvado y ganchoso, que podrían estar implicados en la fisiopatología del síndrome subacromial²³. Por su parte, Uhthoff destacaba el importante papel del ligamento coracoacromial²⁴. Más recientemente, estos mismos hallazgos se han demostrado mediante ecografía y resonancia magnética²⁵. En segundo lugar, la teoría de los factores intrínsecos, que determina que la degeneración y rotura del manguito rotador es dependiente de su propia naturaleza y que se acentúan con la degeneración debida a la edad⁵. Se producen cambios en la composición y estructura de la matriz extracelular: colágeno, proteoglicanos y contenido porcentual de agua. Actualmente

es considerada una entidad de origen multifactorial incluyendo la degeneración asociada a la edad y una historia de microtraumatismos y macrotraumatismos. Yamamoto y cols. encontraron recientemente que los factores que podrían considerarse de riesgo son la historia de antecedente traumático, la aparición sobre el brazo dominante y la edad²⁶. La hipercolesterolemia, el tabaquismo y la predisposición genética han sido implicados también en la fisiopatología²⁷. Carbone y cols. han publicado recientemente que existe una correlación entre el número de cigarrillos fumados diariamente y a lo largo de la vida, la incidencia de roturas y el tamaño de las mismas²⁸.

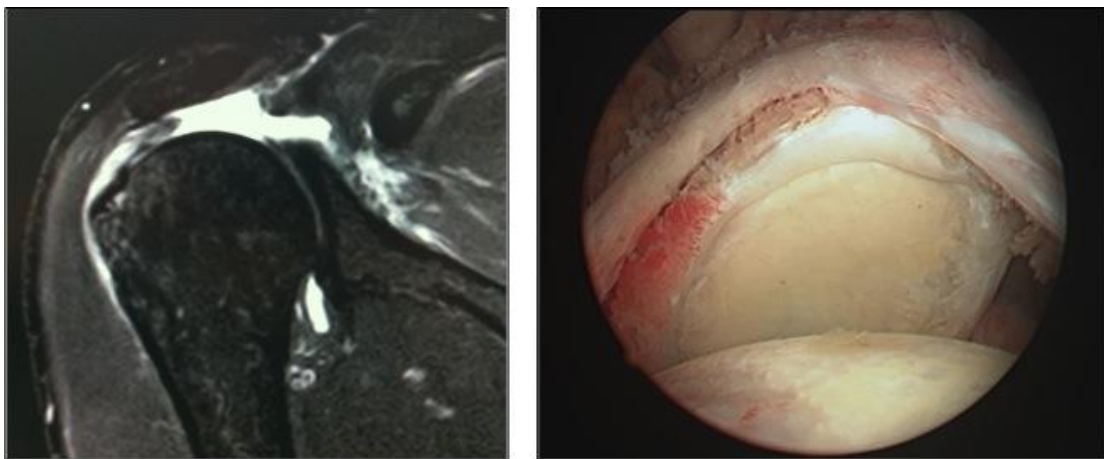


Figura 8. A) Imagen correspondiente a un corte coronal de resonancia magnética de un hombro derecho en una secuencia T2, en la que se aprecia una rotura de manguito rotador con retracción medial hasta la glenoides. B) Imagen artroscópica correspondiente al mismo paciente en el que se comprueba la magnitud de la rotura. Se puede apreciar la cabeza humeral en un plano inferior y la glenoides en el fondo de la imagen.

Numerosos autores han postulado que las lesiones degenerativas del manguito rotador afectan de forma casi invariable al tendón supraespinoso, comenzando típicamente en su porción anterior, cerca del tendón del bíceps y propagándose desde allí hacia posterior²⁹. Otros autores, sin embargo, defienden la teoría de que las lesiones se inician en la inserción humeral desde la superficie articular a la superficie bursal evolucionando desde una rotura de espesor parcial a una de espesor completo

(Figura 8). Recientemente se ha descrito una nueva teoría en la que mediante estudio ecográfico se ha demostrado que la mayoría de las lesiones degenerativas se iniciarían en la zona de unión de los tendones supra e infraespinoso, aproximadamente a 16 mm del tendón del bíceps³⁰.

La rotura del manguito rotador provoca cambios en la cinemática articular que conducen en su fase final a la artropatía de manguito. Radiográficamente se caracteriza por una migración superior de la cabeza humeral, acetabularización del acromion y disminución del espacio acromiohumeral (Figura 9).



Figura 9. Imagen correspondiente a una proyección radiológica simple anteroposterior de hombro derecho en el que puede apreciarse el ascenso de la cabeza humeral y la acetabularización del acromion. Así mismo puede apreciarse la erosión central glenoidea. Estos cambios forman parte de la denominada Artropatía de Manguito.

Existen numerosas teorías acerca de la historia natural de este proceso. Algunos autores defienden la teoría de que la acción depresora del tendón supraespinoso se pierde y eso supone el ascenso de la cabeza humeral cuando se intenta realizar abducción del hombro. Sin embargo, teorías más recientes basan este desequilibrio en una pérdida del par de fuerzas transversal que se establece entre la porción más anterior del manguito, el músculo subescapular, y la porción más posterior, los músculos infraespinoso y redondo menor³¹. Han Ho y cols.²⁹ han demostrado que la

rotura completa del tendón supraespinoso constituye el estadio crítico para aumentar la capacidad de rotación del hombro y disminuir la capacidad de abducción. Sin embargo, es la progresión de la rotura hacia el infraespinoso la que supondría la aparición de cambios en la cinemática de la cabeza humeral. El pectoral mayor y el dorsal ancho se consideran elementos importantes para estabilizar la cabeza durante el progreso de la rotura.

Cuando el manguito empieza a degenerarse, las fibras de colágeno sufren una degeneración hialina y mixoide y el hueso sufre una metaplasia para convertirse en tejido condroide. Se aprecia una menor cantidad de colágeno global con una presencia mayor del 5% de colágeno tipo III³². Se pueden apreciar procesos de inflamación, calcificación, proliferación vascular e infiltración grasa, no sólo en la zona de inserción del tendón si no en todo el espesor muscular. Se han descrito dos fenómenos característicos. El primero de ellos es la infiltración grasa, que consiste en la sustitución de las fibras musculares por grasa. Al reducirse el área seccional del músculo, se reduce la fuerza máxima que el músculo puede producir. Este fenómeno ocurre al alterarse el ángulo de acción de las fibras musculares. Goutallier lo describió y estableció una clasificación basada en las técnicas de imagen. En ella se divide en 4 grados, en función de la proporción de músculo y tejido graso que pueda apreciarse³³. El segundo fenómeno característico es el de la atrofia muscular, que consiste en una disminución del volumen del músculo, con la consecuente disminución del área seccional del músculo. Este fenómeno conlleva también una disminución de la capacidad para ejercer fuerza (Figura 10).

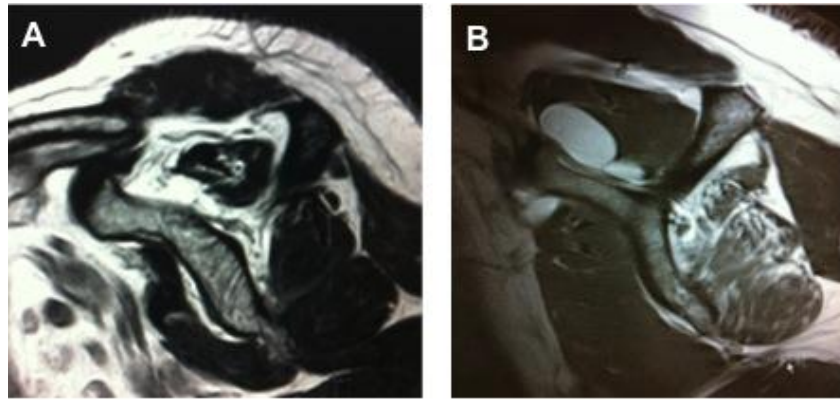


Figura 10. Imágenes correspondientes a cortes sagitales de resonancia magnética de un hombro derecho. A) Se aprecia atrofia muscular del músculo supraespinoso con ocupación por grasa del resto de la fosa supraespinosa; B) Fenómeno de infiltración grasa del músculo infraespinoso. Quiste en fosa supraespinosa.

1.3.2 Clasificación de las roturas del manguito rotador

La primera clasificación fue elaborada por McLaughlin en 1944 que definió las roturas del manguito en función de su forma como transversales, verticales y retraídas. Desde entonces, numerosas clasificaciones han sido propuestas.

- En función de la cronología; Se considera una lesión aguda aquella en la que han pasado menos de 3 meses desde el inicio del dolor en un hombro previamente asintomático. Se considera crónica si han pasado más de 3 meses desde el hecho desencadenante. También existen reagudizaciones de lesiones crónicas, que generalmente se relacionan con un aumento de tamaño en una lesión preexistente.
- En función del tamaño de la lesión. De Orio y Cofield³⁴ clasificaron las roturas en función del diámetro mayor de la misma: pequeñas (menor de 1cm), medianas (1-3 cm), grandes (3-5cm) o masivas (mayor de 5 cm).
- En función del número de tendones afectados, considerando masivas a aquellas que afectan a dos o más tendones³⁵.

- En función del espesor de la lesión; las roturas de espesor parcial son aquellas que afectan a menos del 50% del espesor total y pueden ser bursales o articulares³⁶.

Algunos autores consideraron estas clasificaciones incompletas, por lo que se desarrollaron nuevas clasificaciones que combinaban varios criterios. La clasificación geométrica se basa en las características tridimensionales de las lesiones y las clasifica en 4 tipos³⁷ (Figura 11). El tipo 1 es una rotura con forma de media luna (*crescent*), con una longitud mayor en medio-lateral que antero-posterior, siendo siempre menor de 2 centímetros. El tipo 2 es una lesión longitudinal en la que la longitud medio-lateral es mayor que la anteroposterior, siendo siempre menor de 2 cm. Pueden ser roturas en “L” o en “U”. El tipo 3 son roturas anchas y largas, que miden más de 2 cm en ambos sentidos y que están retraídas medialmente. El tipo 4 está constituido por la artropatía de manguito. La segunda clasificación más utilizada actualmente es la desarrollada por Snyder y cols³⁸, que clasifica las lesiones en: C1, espesor completo de pequeño tamaño; C2, lesión de espesor completo de menos de 2 cm que afecta sólo a un tendón sin retracción medial; C3, lesión de espesor completo, moderada, de un sólo tendón con retracción medial de 3 o 4 cm; C4, rotura masiva con afectación de 2 o más tendones, retracción medial y desestructuración del tendón remanente.

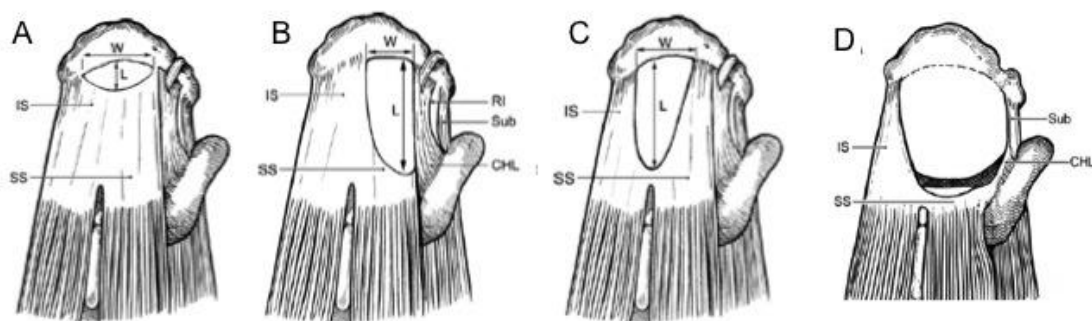


Figura 11. Esquema de los diferentes tipos de rotura del manguito rotador en la clasificación geométrica A) Rotura tipo “Crescent”; B) Rotura longitudinal tipo “L” C) Rotura longitudinal tipo “U” D) Rotura masiva con retracción medial. W: anchura; L: longitud; RI: intervalo rotador; Sub: subescapular; chl: ligamento coracohumeral; SS: supraespinoso; IS: infraespinoso (Davidson J y S. Burkhart . *Arthroscopy* 2010; 26: 417-24).

1.3.3 Epidemiología de las roturas del manguito rotador

La patología del manguito rotador es considerada uno de los problemas más frecuentes en las enfermedades del sistema músculo-esquelético³⁹. Cursa fundamentalmente con dolor e incapacidad funcional del hombro que se manifiesta mediante debilidad en la elevación y las rotaciones. Aunque la incidencia real es difícil de conocer, debido a la gran cantidad de roturas que cursan de forma asintomática, se sabe que la incidencia de las lesiones degenerativas del manguito rotador aumenta con la edad⁴⁰(Figura 12). Un estudio realizado en cadáveres demostró que la incidencia de lesiones de espesor completo de manguito rotador era del 30% en mayores de 60 años y tan sólo del 6% en aquellos menores de 60 años²⁶. Las roturas de espesor parcial parecen tener una incidencia doble que las de espesor completo según algunos autores, encontrándose en un 32% de 306 cadáveres estudiados cuya media de edad era de 59 años. Los estudios epidemiológicos basados en cadáveres cuentan con importantes limitaciones ya que no se pueden recoger datos sobre la presencia de síntomas y otros factores demográficos. Recientemente se han realizado estudios prospectivos en pacientes vivos mediante ecografía y resonancia magnética. Yamaguchi y cols⁴¹. realizaron una revisión ecográfica bilateral de 588 en la que la incidencia en pacientes con una edad superior a los 60 años era del 50%; Las roturas masivas eran más frecuentemente sintomáticas que las roturas parciales y la probabilidad de tener una rotura masiva contralateral si un paciente tenía una rotura masiva sintomática era del 35.5%.

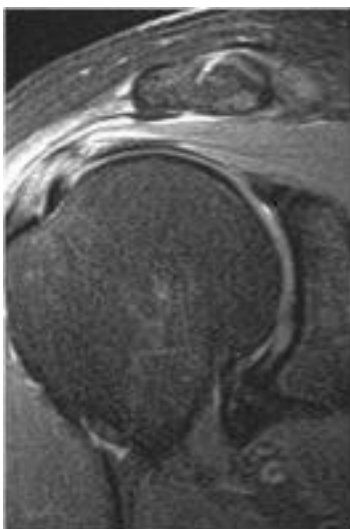


Figura 12. Imágenes coronales de resonancia magnética de un hombro derecho en secuencia T2, en el que se aprecia tendinopatía del tendón supraespinoso. Ésta se manifiesta por un aumento de señal en su tercio distal. Puede apreciarse así mismo la presencia de bursitis subacromial.

1.3.4 Tratamiento de las roturas del manguito rotador

El objetivo del tratamiento de las roturas del manguito rotador es disminuir el dolor y mejorar la función del hombro. El tratamiento conservador puede ser una opción cuya duración y objetivos deben ser individualizados en función de la respuesta al mismo y las necesidades funcionales del paciente, aunque existe el riesgo de progresión de la lesión y el desarrollo de cambios artrósicos en la articulación³⁰. Consiste en un cambio en las actividades que desencadenan el dolor, antiinflamatorios y una terapia de rehabilitación cuyos objetivos son fortalecer el manguito y la musculatura periescapular. Las infiltraciones subacromiales de corticoides son controvertidas ya que aunque disminuyen el dolor y mejoran la movilidad de forma inmediata, podrían provocar degeneración tendinosa a largo plazo y comprometer el resultado de la posible reparación⁴². El tratamiento conservador podría recomendarse en pacientes mayores de 70 años con roturas crónicas, roturas masivas con cambios irreversibles, importante infiltración grasa, migración proximal de la cabeza humeral o artrosis establecida. También sería una indicación relativa pacientes de cualquier edad con roturas pequeñas de menos de un 1 cm.

La decisión de optar por el tratamiento quirúrgico debe basarse en el tamaño y cronicidad de la lesión, en la presencia de cambios irreparables en el manguito o en la articulación glenohumeral y en la edad del paciente. La indicación ideal del tratamiento quirúrgico serían roturas de tamaño mediano, mayores de 1 cm, que sean agudas, principalmente en pacientes jóvenes²⁷. Las denominadas roturas agudas sobre crónicas constituyen otro grupo candidato a una intervención quirúrgica y se manifiestan clínicamente como roturas agudas, con pérdida súbita de fuerza y movilidad a cualquier edad. La reparación del manguito rotador puede realizarse mediante cirugía abierta o artroscopia. Pueden asociarse gestos quirúrgicos que actúan sobre la superficie inferior del acromion, la articulación acromioclavicular o el tendón de la porción larga del bíceps. La cirugía abierta se realiza mediante un abordaje anterosuperior, desinsertando la región anterior del deltoides. También se ha descrito la técnica “mini-abordaje” en la que las fibras del deltoides se separan y no se desinsertan⁴³. En ambos casos la cirugía consiste en la sutura directa del tendón al hueso, en la región correspondiente del troquíter, utilizando una sutura gruesa, generalmente no reabsorbible. También se puede realizar mediante la utilización de anclajes. La cirugía artroscópica se realiza generalmente mediante tres o más portales a través de los cuales se identifica y repara la lesión⁴⁴. Los tres portales principales son el portal posterior, el portal del intervalo rotador y el portal anterolateral. La sutura se realiza mediante anclajes que se colocan en la región correspondiente e intenta reproducir la inserción anatómica del tendón. Para ello se han descrito numerosas técnicas de reparación con una o dos hileras de suturas, con el fin de aumentar la superficie de contacto del tendón en el lecho humeral⁴⁵ (Figura 13).

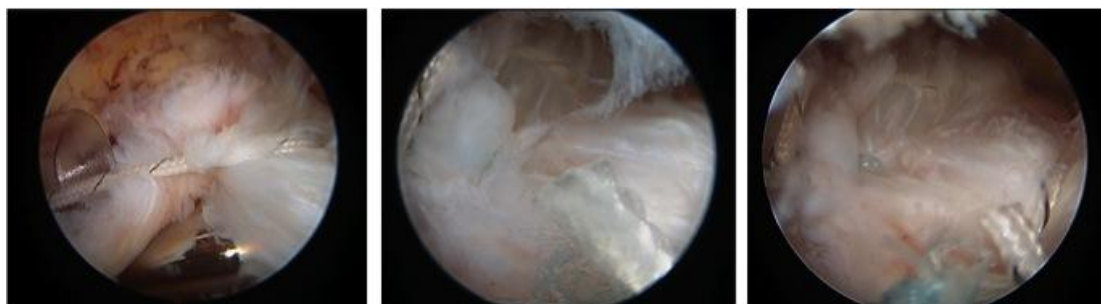


Figura 13. Imágenes correspondientes a detalles de una cirugía artroscópica de reparación del manguito rotador en el que pueden apreciarse los nudos de sutura en un modelo de reparación lado a lado.

A pesar de la gran utilización de las técnicas artroscópicas mediante anclajes con buenos resultados, algunos autores han propuesto en los últimos años la sutura transósea del tendón mediante artroscopia o asistida por mini abordaje (*“mini-open”*). El objetivo es conseguir una superficie de contacto mayor evitando el micromovimiento en la zona de reparación y así favorecer la cicatrización⁴⁶.

El protocolo de rehabilitación postquirúrgica depende del tamaño de lesión y de la calidad del tejido reparado. En general, la movilidad activa libre y los ejercicios de fortalecimiento no se inician hasta las 6 u 8 semanas postoperatorias. El período para la rehabilitación completa puede durar entre 6 y 12 meses⁴⁷. Recientemente, Keener y cols⁴⁸ han publicado sus resultados comparando un protocolo de movilización pasiva precoz con un protocolo de inmovilización sin encontrar diferencias con respecto a la tasa de curación o el resultado funcional.

1.3.5 Resultados del tratamiento de las roturas del manguito rotador

Los resultados de la cirugía del manguito rotador son variables debido a la heterogeneidad en el diagnóstico y las múltiples opciones terapéuticas. Para roturas de espesor completo, la cirugía abierta proporciona resultados satisfactorios en un 87,5 % de los casos en cuanto a mejoría de dolor y grado de satisfacción del paciente⁴⁹. La

principal complicación que se ha descrito es la debilidad en flexión anterior y con el uso del brazo por encima de la cabeza, lo que puede deberse a fracaso de la reparación o a una desinserción o denervación de la porción anterior del deltoides⁵⁰. Los resultados de la cirugía artroscópica son similares, con resultados satisfactorios en el 85-95% de los casos y ciertos beneficios respecto a la cirugía abierta, como son menor dolor postoperatorio, menor riesgo de lesión del deltoides y una recuperación precoz⁵¹. La cirugía del manguito rotador parece ser más efectiva en la disminución del dolor preoperatorio que en el incremento de la fuerza y la función. Los factores que pueden predisponer a un peor resultado son: el tamaño de la lesión, la calidad del tejido reparado, el grado de disfunción preoperatoria, la edad menor de 55 años y el hecho de que el paciente pertenezca al entorno laboral⁵². Recientemente, Goutallier³³, como se mencionó anteriormente, introdujo el concepto de infiltración grasa del manguito rotador. Este fenómeno se produce como consecuencia de la retracción medial del vientre muscular que puede ocurrir tras sufrir una rotura del tendón. Esta retracción provoca una alteración del ángulo de inserción de las fibras y como consecuencia la infiltración grasa del músculo⁵³. Se divide en 4 grados en función del porcentaje del volumen muscular ocupado por grasa. La evaluación pre-quirúrgica del grado de infiltración grasa del manguito rotador se considera actualmente un factor determinante del éxito de la reparación, especialmente la de los músculos subescapular e infraespinoso. Sin embargo, la ausencia de infiltración grasa no garantiza la cicatrización del tendón. Otro fenómeno importante pero diferente del primero es la atrofia grasa, en el que se produce una disminución de volumen del vientre muscular, pero el músculo que se conserva se mantiene intacto desde un punto de vista histológico⁵⁴.

La re-rotura del manguito rotador tras la reparación es un problema frecuente que se ha comprobado mediante técnicas de imagen como ecografía y resonancia magnética⁵⁵(Figura 14). La incidencia en los diferentes estudios es muy variable, entre un 11% y un 94%, lo que probablemente dependa del tamaño de la rotura de la primera cirugía y del grado de degeneración grasa del tendón^{52,56,58}. Se ha observado que es posible mantener una buena función a pesar de la re-rotura lo que puede deberse a la disminución del dolor con respecto al preoperatorio y al fortalecimiento de la musculatura anterior y posterior del manguito y del deltoides⁵⁹. Los resultados de la cirugía de revisión son peores que los de la cirugía primaria, siendo la tasa de resultados satisfactorios del 69% frente a un 31% de no satisfactorios⁶⁰. Los factores predictores de un mejor resultado son: integridad del deltoides, buena calidad del tejido del manguito remanente, elevación activa preoperatoria por encima de la horizontal y un único antecedente de cirugía. Keener y cols⁵⁷. encontraron en un reciente estudio que 17 de 18 revisiones de reparación de manguito rotador habían fracasado en el primer año de seguimiento constatándose una re-rotura; sin embargo, 13 pacientes presentaban una puntuación en la escala de la Sociedad Americana de Cirugía de Hombro y Codo mayor o igual a 90 puntos y todos referían mejoría en términos de dolor, rango de movilidad, capacidad para las actividades de la vida cotidiana y sensación subjetiva de debilidad.

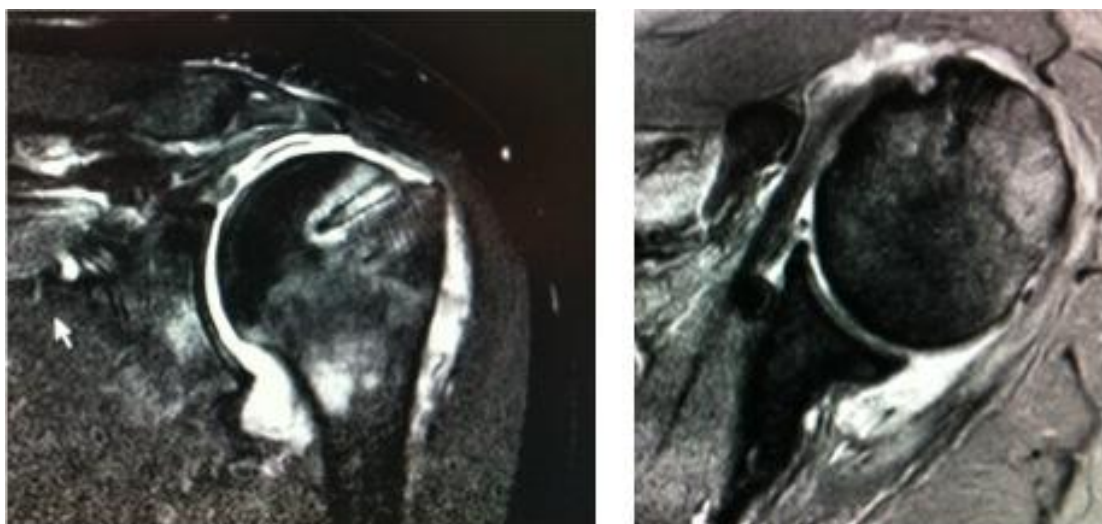


Figura 14. Imágenes de resonancia magnética en un corte coronal y un corte axial de un hombro izquierdo, en secuencia T2, en el que se aprecia una re-rotura del manguito rotador. Se puede apreciar edema óseo alrededor de la zona del anclaje y un ascenso de la cabeza humeral con respecto a la cavidad glenoidea.

Como consecuencia de estos resultados de la reparación del manguito rotador el objetivo principal sigue siendo disminuir la tasa de re-rotura. Por una parte, se ha intentado incidir en los factores técnicos, con nuevos métodos quirúrgicos y materiales en la sutura. En segundo lugar, y más recientemente, numerosas líneas de investigación intentan conseguir mejorar la biología de la reparación. Se han descrito numerosos factores técnicos que pueden influir en la calidad de la reparación. Además de analizar la forma adecuada de suturar cada tipo de lesión, se han desarrollado nuevas técnicas de sutura que intentan reproducir de forma más exacta la anatómica de la inserción del tendón y maximizar la superficie de contacto hueso-tendón. Grasso y cols⁶¹. realizaron un estudio clínico prospectivo y aleatorizado en el que se incluyeron 80 pacientes con roturas completas. En este estudio comparaban sutura mediante hilera simple con sutura mediante doble hilera sin encontrar, a los dos años de seguimiento, diferencias significativas entre ambos grupos. Se han estudiado ampliamente el tipo de anclaje, la sutura que porta el anclaje y la orientación en la que éste se introduce en el húmero⁶². Milano y cols⁶³. en un reciente estudio

prospectivo aleatorizado compararon los anclajes metálicos con los biodegradables sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos con un seguimiento mínimo de dos años(Figura 15). También se ha descrito en los últimos años la utilización de anclajes con tres suturas, que permitirían colocar menor número de anclajes para la reparación de una misma lesión⁶⁴. Se han revisado las propiedades que debe tener el nudo artroscópico definiéndose como ideal un nudo estático de cirujano, compuesto de tres medias vueltas en la misma dirección seguido de tres medias vueltas en la otra dirección con postes alternantes⁶⁵.



Figura 15. Imágenes correspondientes a dos de los modelos de anclajes óseos que se utilizan para la sutura del manguito rotador. Anteriormente metálicos como en la imagen de la izquierda y de nuevos biomateriales a la derecha.

Sin embargo, más recientemente, estudios en modelos animales de manguito rotador o ligamento cruzado han indicado que la causa de este fracaso en la reparación hueso-tendón podría tener un origen biológico y deberse a la incapacidad de regenerar el tejido especializado que existe en esta interfase y que se denomina entesis⁶⁶. Debido a estos hallazgos, los esfuerzos científicos se han centrado en crear un ambiente biológico que favorezca la cicatrización y que se abordarán en profundidad más adelante.

2. La entesis: Cicatrización interfaz Hueso-Tendón.

2.1 La entesis

La regeneración tisular en la interfase hueso tendón, como ocurre en el manguito rotador, es un proceso complejo. La diferencia en la rigidez entre ambos tejidos hace que se produzca un gran estrés mecánico en la zona de regeneración⁶⁷. La entesis es un tejido transicional que permite transmitir de forma eficiente esta energía entre ambos tejidos debido al cambio gradual que se produce en su estructura, su histología y su comportamiento biomecánico. La morfogénesis de la entesis depende tanto de factores mecánicos como biológicos. Existen dos tipos de entesis, directa o indirecta, en función de cómo se unan las fibras de colágeno al periostio del hueso⁶⁸. En el caso del manguito rotador, la inserción es directa, algo que también ocurre en la inserción del ligamento cruzado de la rodilla, del tendón de Aquiles, del tendón rotuliano o en la inserción femoral del ligamento colateral medial de la rodilla. Consta de 4 zonas de transición gradual: tendón, fibrocartílago no mineralizado, fibrocartílago mineralizado y hueso¹ (Figura 16).

- Zona 1: posee la misma estructura que el tendón. Predominan las fibras de colágeno tipo I con pequeñas cantidades del proteoglicano denominado decorina.
- Zona 2: fibrocartílago no mineralizado. Esta compuesto por fibras de colágeno II y III con pequeñas cantidades de colágeno I, IX y X y pequeñas cantidades de agrecanos y decorina.
- Zona 3: está compuesta por fibrocartílago mineralizado, con predominancia de colágeno tipo I con alto contenido mineral.
- Zona 4: corresponde a la zona de inserción ósea.

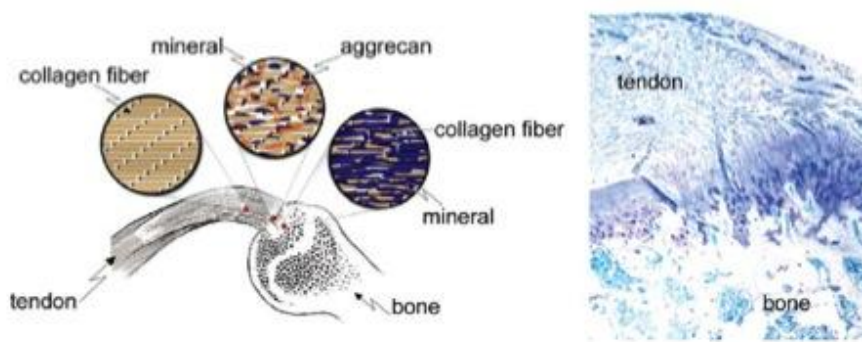


Figura 16. Morfología de la zona de unión del tendón supraespinal al hueso (*collagen fiber*: fibra de colágeno; *mineral*: mineral, *aggrecan*: agrecanos; *bone*: hueso, *tendon*: tendón, del inglés). (Thomopoulos y cols. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 10:1, 35-45)

La transición de un material flexible como es el tendón, a un material rígido como es el hueso, se consigue mediante el aumento gradual de fibras mineralizadas y el aumento en la dispersión de las fibras de colágeno. La composición molecular de la entesis parece estar relacionada con las fuerzas a las que está sometida, que son fuerzas de compresión locales debido al ángulo de inserción oblicuo en el hueso⁶⁹. El hecho de que exista una zona de tejido anatomopatológicamente idéntico al tendón y otra zona idéntica al hueso hace que no existan unos claros límites sobre dónde comienza y termina la entesis⁶⁸.

2.2 El desarrollo de la entesis

El estudio del desarrollo de la entesis es importante para determinar qué factores son necesarios para regenerar de forma eficaz la zona transicional tendón-hueso¹. La formación del hueso y del tendón son procesos que tienen lugar al mismo tiempo durante la vida fetal, sin embargo, la formación del tejido transicional entre ambos ocurre en la vida postnatal. La diferenciación a fibrocartílago desde células tendinosas en la entesis implica cambios en la forma de las células y en las interacciones entre ellas⁷⁰. Las células pierden contacto con sus células vecinas, se redondean y se hacen mayores en tamaño y comienzan a expresar marcadores de cartílago, especialmente

colágeno tipo II y agrecanos⁷¹. Galatz y cols⁷². estudiaron el desarrollo de la entesis un modelo experimental de manguito rotador y demostraron que la interfase hueso-tendón no se convierte en un fibrocartílago maduro hasta los 21 días post-natales. Los fibroblastos del tendón supraespinoso expresaban colágeno tipo I en todo momento. El colágeno tipo II era expresado en primer lugar por los condrocitos en el fibrocartílago y en el fibrocartílago mineralizado a los 7 días y persistía en el fibrocartílago mineralizado a los 56 días. El colágeno tipo X se observaba inicialmente en los condrocitos del fibrocartílago mineralizado a los 14 días y persistía a los 56 días. Se apreciaba un cambio de TGF- β 3 a TGF- β 1 a los 15,5 días.

Al igual que en la formación del hueso o del tendón, este proceso depende de factores biológicos y mecánicos⁶⁹. Dentro de los factores biológicos, varios factores de transcripción han sido relacionados. Scleraxis (Scx) es un factor de transcripción asociado con la tenogénesis que se expresa en los progenitores y en todas las células maduras que pertenecen a tejidos tendinosos⁷³. Otro factor de transcripción, SOX-9 es necesario para la condrogénesis, se expresa en los condrocitos proliferativos y es responsable de la diferenciación de los condrocitos⁷⁴. Indian hedgehog(Ihh) y la proteína relacionada con la paratohormona (PTHrP) conducen la proliferación de los condrocitos y su diferenciación y juntos forman un ciclo de retroalimentación negativa que mantiene una población de células proliferativas para el desarrollo de la placa de crecimiento. También estaría implicado el receptor de membrana Patched-1⁷². Todos estos factores también se han identificado en la placa de crecimiento y pueden representar un papel importante en el desarrollo de la entesis. La gradación en la expresión de estos factores puede resultar en la estratificación en la estructura y composición a lo largo de las diferentes zonas de la entesis. Por ejemplo, la cantidad de depósito mineral en la entesis madura puede deberse a la gradual expresión de

factores osteogénicos como Runx2 y BMP2. La formación de fibrocartílago estaría determinada por la mayor expresión de PTHrP, Ihh, y Sox9 (Figura 17). Por último, la diferenciación a tendón estaría condicionada por la expresión de factores específicos de tendón como scleraxis, BMP-12 y tenomodulina⁷².

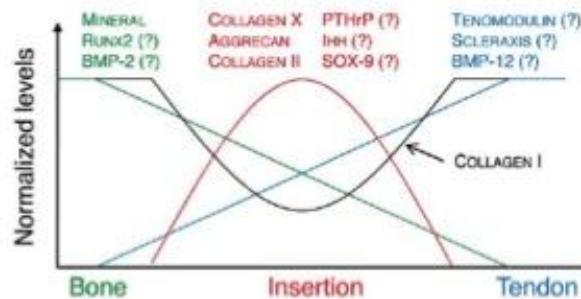


Figura 17. La gradación de los diferentes factores biológicos puede ser la responsable de promover la diferenciación celular y la formación del tejido. Las gradaciones minerales en la entesis madura se muestran en verde y son mayores en hueso y menores en tendón. Esto podría deberse a la expresión de factores osteogénicos como Runx2 y BMP-2. Las gradaciones medidas en fibrocartílago se muestran en rojo y son bajas en tendón y hueso y altas en la región de inserción, probablemente por la mayor expresión de PTHrP, Ihh y Sox9. Las diferencias en la tenogénesis se muestran en azul y son mayores en tendón y menores en hueso. Los factores de mayor expresión son BMP-12, scleraxis y tenomodulina (Thomopoulos y cols. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 10:1, 35-45)

Otro aspecto importante es la influencia de los factores mecánicos en las características y evolución de los tejidos músculoesqueléticos⁷⁵. En el tejido óseo, muchos estudios han demostrado que la arquitectura del hueso trabecular y el grosor de la cortical dependen del estrés ambiental. De igual manera ocurre en el tendón, donde la ausencia de carga parece provocar una rápida degeneración del mismo⁷⁶. Sin embargo, se desconocía si estos estímulos mecánicos eran también determinantes en el desarrollo de la entesis. Recientemente, Thomopoulos y cols. diseñaron un modelo animal de ratón en el que se suministraba toxina botulínica A al músculo supraespinoso a las 24 horas del nacimiento y los resultados mostraron que la ausencia de carga en el periodo postnatal tardío (a partir de los 14 días postnatales),

impedía la acumulación del depósito mineral, la formación de fibrocartílago y la organización de las fibras de colágeno⁷⁵. Este hallazgo corroboraría la teoría de que los estímulos biomecánicos podrían ser determinantes en la formación de la entesis.

2.3 Biología de la reparación de la entesis

La reparación quirúrgica de las lesiones que ocurren en la zona de transición hueso-tendón fracasa de forma frecuente⁷⁷. Han sido propuestas numerosas teorías al respecto. Algunas de ellas apuntan a la pobre vascularización en la zona fibrocartilaginosa de la entesis como posible causa, aunque no se ha demostrado una relación directa entre el aumento de vascularización y un mejor proceso de reparación del manguito⁶⁶. Kovacevic y cols⁷⁸. han descrito que aunque la vascularización en la zona crítica del manguito aumenta en el postoperatorio inmediato, ésta disminuye con el paso del tiempo. Estudios animales han mostrado que la estructura estratificada característica de la entesis no se recrea incluso en estudios a largo plazo a los 3 o 4 meses⁷⁹. El tejido que constituye finalmente la interfase tendón-hueso difiere en gran medida de la entesis nativa ya que en lugar de las 4 zonas mencionadas anteriormente, encontramos una capa de tejido cicatricial fibrovascular en el que predomina el colágeno tipo III⁶⁶. Los cambios más llamativos de esta respuesta reparativa fallida son la excesiva formación de tejido cicatricial y la ausencia de formación de fibrocartílago.

El proceso reparativo puede ser dividido en 3 fases: la fase inflamatoria, la fase de reparación y la de remodelación⁸⁰. La cascada inflamatoria es un proceso complejo de respuesta tisular en el que están implicadas numerosas citoquinas⁸¹. Las citoquinas son moléculas multifuncionales que desempeñan un papel importante en la quimiotaxis, la proliferación y la diferenciación celular así como en la síntesis de la matriz extracelular. Cada factor de crecimiento ha demostrado tener al menos una

función específica en el proceso de la reparación y se expresan de forma temporal durante las diferentes fases⁶⁶. Diaz-Heredia y cols. demostraron en un estudio en ratas cómo se producía una variación gradual de diferentes factores incluyendo VEGF, IL-1 y TGF- β 1⁸¹. La fase inflamatoria comienza en la primera semana tras la reparación del manguito rotador. Se caracteriza por la presencia e infiltración del tejido por neutrófilos y macrófagos. Los macrófagos segregan TGF β 1 que aumenta la actividad proteínasa y la formación de colágeno. El TGF β 1 es un factor de crecimiento pro-inflamatorio que estimula la proliferación de matriz extracelular y en presencia de estos macrófagos que han migrado de forma precoz, parece constituir el principal estímulo en la formación del tejido cicatricial. Así mismo se ha demostrado la presencia de macrófagos locales en la zona de reparación aunque en menor cuantía. Su función parece ser anabólica a diferencia de la función catabólica que se atribuye a los macrófagos reclutados⁶⁶. IL-1 presenta un pico de expresión tanto en el tendón como en la unión miotendinosa a las 24 horas de la reparación. En la huella ósea el aumento se produce de forma más progresiva y alcanza su pico a los 14 días. La presencia de VEGF se mantiene elevada durante todo el proceso, siendo más marcado en la huella ósea y el tendón que en la unión miotendinosa⁸¹. La fase de reparación se caracteriza por el importante papel que desempeñan los factores de crecimiento. Las proteínas morfogenéticas (BMP) 12,13 y 14 se expresan en los fibroblastos activos y son fundamentales en la formación de la nueva interfase. El factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF) provoca un aumento en la proliferación de los fibroblastos y suprime la formación de colágeno. Está presente en moderadas cantidades durante todo el proceso, incluyendo la fase de remodelación. El factor de crecimiento insulínico (IGF1) estimula la síntesis de proteínas y la proliferación celular y disminuye el edema tisular. El factor de crecimiento derivado de las

plaquetas (PDGFb está presente en pequeñas cantidades y se relaciona con la presencia del colágeno tipo I. Las metaloproteasas (MMPs) son proteasas dependientes de zinc capaces de degradar las proteínas de la matriz extracelular como el colágeno y la elastina. Parece que tanto la MMP-2 como el factor tisular inhibidor de metaloproteasas (TIMP-1) son determinantes en la fase de remodelación.

Algunos autores han relacionado la incapacidad para regenerar la entesis nativa con la expresión incompleta y anormal de los genes implicados en su formación durante el periodo embrionario¹. Se ha demostrado que la cicatrización fetal en piel y en tendón ocurre sin expresión de TGF- β 1, con expresión de TGF- β 3 y sin formación de cicatriz, por lo que se considera un proceso de regeneración. Por el contrario, en la vida postnatal, el TGF- β 1 se encuentra activo en todas las etapas mencionadas anteriormente y la curación adulta en esos mismos tejidos ocurre con formación de cicatriz⁸². El papel de las isoformas de TGF- β en el manguito rotador aún no está definido. Galatz y cols⁶⁶. realizaron un trabajo en el que estudiaban el proceso de cicatrización de una reparación de manguito rotador en ratas y analizaron los procesos biológicos que ocurrían en diferentes puntos de sacrificio. Encontraron que el colágeno tipo I y su correspondiente mRNA incrementaban significativamente hasta los 10 días y alcanzaban un nivel estable entre los 28 y 56 días. El colágeno tipo III se comportaba de manera similar, con una elevación inicial que mantenía hasta los 56 días. El TGF β -1 presentaba un pico localizado en la zona de formación de la cicatriz a los 10 días aproximadamente. El TGF β -3 no se encontraba en la zona de la inserción y la densidad de proliferación celular tenía un comportamiento paralelo al TGF β 1(Figura 18).

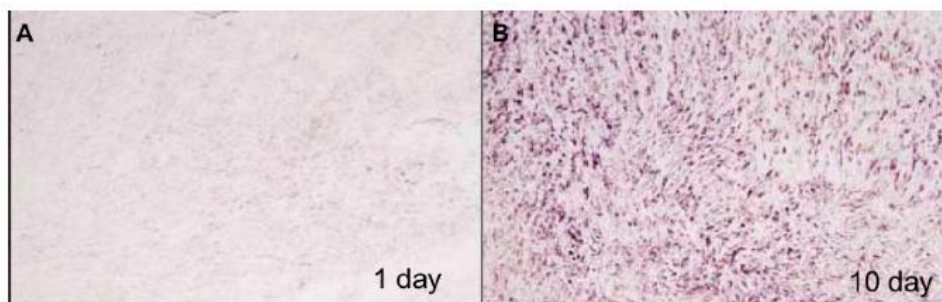


Figura 18. Imágenes histológicas de un modelo de manguito rotador en ratas que muestra el tejido proximal al sitio de inserción (40x). La expresión del RNA que codifica para TGF- β 1 es dramáticamente mayor a los 10 días (B) que a un día de sacrificio (A). (Galatz y cols. *J Orthop Res* 24:3, 541-50)

Desde el punto de vista de aplicación práctica al manguito rotador, numerosos factores exógenos pueden condicionar el proceso de cicatrización. Se ha demostrado que los tratamientos antiinflamatorios pueden tener un efecto negativo en la cicatrización del manguito al inhibir la cicloxigenasa-2⁸³. Thomopoulos y cols⁸⁴. estudiaron en un modelo murino de rotura del manguito rotador la relación entre las citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF α) y las antiinflamatorias (IL-4). Parece que en la primera fase se necesita cierta respuesta inflamatoria para iniciar la reparación inmediata. Sin embargo, una vez que se ha iniciado, es esencial el equilibrio entre los fenómenos proinflamatorios y antiinflamatorios. También los corticoides locales en forma de inyección subacromial son utilizados frecuentemente como tratamiento en la enfermedad degenerativa del manguito rotador⁴². Parece que éstos podrían retrasar la cicatrización mediante la inhibición de la proliferación celular, la disminución de la síntesis de colágeno y la debilitación de sus fibras. Así mismo, parecen aumentar la concentración de colágeno tipo III. Los esteroides anabolizantes pueden alterar la morfología del tendón favoreciendo su ruptura pero su papel en la cicatrización aún es controvertido. La presencia de nicotina también es deletérea⁸⁵. Modelos animales han demostrado que la inmovilización tras la reparación, es decir, la ausencia de cargas,

permite un mejor proceso de cicatrización creando un tejido con mejores propiedades viscoelásticas: mayor presencia porcentual de colágeno tipo I frente al colágeno tipo II y un aumento de la expresión de colágeno tipo XII y II y de agreganos⁸⁶.

3. Aplicación clínica de la biología a la reparación del manguito rotador

Desde que estos fenómenos celulares y moleculares se identificaron como posible causa del fracaso regenerativo en la entesis, numerosos grupos de estudio han dirigido sus investigaciones a mejorar la respuesta biológica del tejido a la reparación.

3.1 Componentes celulares

Se basan en el aporte de una estructura que favorezca la cicatrización en un tendón previamente degenerado. Los injertos tendinosos tienen como función disminuir la tensión entre el hueso y el tendón, pero también pueden favorecer el proceso de reparación biológico mediante el aporte de células y factores de crecimiento o al servir como andamiaje para la reparación⁸⁷. Moore y cols⁸⁸. utilizaron injerto alogénico de cadáver en 28 pacientes con roturas masivas del manguito rotador sin demostrar mejores resultados que el desbridamiento y acromioplastia de forma aislada. Hubo dos complicaciones, una infección y un rechazo agudo del injerto. Cho y cols⁸⁹. describieron la utilización de autoinjerto del tendón del bíceps obtenido en el mismo procedimiento quirúrgico mediante tenotomía, demostrando mayor fuerza y menor tasa de fracaso estructural comprobado mediante resonancia magnética a los 12 meses postoperatorios.

3.2 Componentes extracelulares

Para mejorar los problemas de rechazo de los injertos tisulares se desarrollaron las matrices extracelulares que pueden ser: xenogénicas (mucosa intestinal porcina),

alogénicas (cadáver) o sintéticas (ácido poliglicólico, ácido poliláctico). Sirven como puente entre ambas estructuras y permiten un crecimiento celular alineado y una mejor disposición de las fibras de colágeno. Se utilizaron inicialmente en estudios animales^{90,91,92} y recientemente algunas de estas matrices han sido aprobadas para su uso en seres humanos⁹³. Las xenogénicas y alogénicas deben ser sometidas a un proceso de “des-celularización” que puede ser físico, químico o enzimático^{91,92}. Este paso es crítico para poder evitar la respuesta inmune del huésped y evitar así la presencia de infiltrado inmunocelular, inmunoglobulinas, factor del complemento C5b, TNF α o macrófagos activados. Los resultados publicados han sido variables⁹³. Existen muchos productos comerciales cuya utilización ha sido controvertida. De ellos el que tiene un uso más extendido y ha sido mejor estudiado en modelos de roturas del manguito rotador es una matriz alogénica denominada GraftJacket^R que se obtiene a partir de dermis humana. Ide y cols⁹⁰. encontraron en un estudio experimental que aquellos animales en los que la sutura se suplementó con una matriz dérmica, presentaban mejores propiedades histológicas y biomecánicas en todos los puntos del estudio. En un estudio clínico en pacientes con roturas masivas del manguito rotador, Bond y cols⁹⁴. encontraron una tasa de fracaso de la reparación del 19% frente al 38-95% que habían obtenido en otras series de roturas con las mismas características. La mayor parte de los estudios que han sido realizados en humanos son de nivel IV de evidencia científica, por lo que aún son necesarios ensayos clínicos aleatorizados que confirmen estos resultados. De hecho, Iannotti y cols⁹⁵., en un estudio prospectivo aleatorizado en roturas masivas del manguito rotador, no encontraron diferencias significativas en los resultados clínicos ni en el índice de cicatrización. De forma aislada, estas matrices suponen únicamente un beneficio mecánico sin proporcionar un aporte biológico a la reparación, lo que podría

considerarse insuficiente. Por ello, en los últimos años se ha descrito la utilización de estas matrices como soporte para otras terapias biológicas⁹⁶ y su manipulación genética para convertirlas en estructuras bioactivas⁹⁷.

3.3 Inhibidores de metaloproteasas

Como se mencionó anteriormente, la metaloproteasas (MMPs) son proteasas dependientes de zinc cuya función, de forma colectiva, es mantener y remodelar la matriz extracelular de los tejidos conectivos⁹⁸. Una actividad excesiva de las MMPs puede llegar a provocar debilidad progresiva en la matriz extracelular de la que dependen los tendones. Normalmente, la actividad de la metaloproteasa está disminuida por los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs). Éstos son inhibidores endógenos que permiten regular el complejo equilibrio entre el proceso reparativo y el degenerativo y mantener la homeostasis de la matriz extracelular. Sin embargo, en determinadas situaciones puede existir una alteración en la expresión de estas proteínas y sus inhibidores. Recientes estudios han relacionado estas enzimas con el crecimiento tumoral, la enfermedad aneurismática vascular y la remodelación tisular que ocurre tras la cirugía, incluyendo el modelo de manguito rotador pre y postquirúrgico^{99,100,101}. Castagna y cols¹⁰¹. demostraron en un estudio en manguito rotador humano que la concentración de MMPs y de TIMPs estaba alterada tanto en las zonas de rotura del manguito como en zonas sanas. En cuanto a su aplicación clínica, numerosos grupos de investigación han publicado sus resultados tanto en modelos de manguito rotador como en otras tendinopatías. Bedi y cols¹⁰². realizaron un estudio experimental de reparación de manguito rotador en el que administraban doxiciclina de forma oral tras la cirugía para provocar una inhibición de la MMP-13. Esta metaloproteasa está especialmente elevada en el tendón del manguito rotador degenerado con rotura, tanto su transcripto (mRNA) como su forma proteica¹⁰⁰. Las

tetraciclinas son antibióticos que inhiben la actividad de las MMPs y su administración local o sistémica es capaz de disminuir la degeneración del hueso, cartílago o tendón asociado a un exceso de estas enzimas. En el análisis histológico de las muestras tras su aplicación se ha encontrado una mayor cantidad de fibrocartílago, una mejor organización del colágeno y una mayor resistencia de la entesis a las 2 semanas. Sin embargo, no sabemos si estos resultados se mantendrán a largo plazo o corresponden sólo al momento inmediato a la aplicación.

3.4 Factores de crecimiento

Aunque la fisiopatología de la tendinopatía del manguito rotador es aún controvertida, los avances en la biología molecular han permitido avanzar en su conocimiento¹⁰³. Parece que la cicatrización de la interfase hueso-tendón depende del crecimiento del hueso en la zona de la entesis más mineralizada y que determinados factores osteoinductores podrían favorecer este proceso⁶⁶. Numerosos factores de crecimiento incluyendo las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), el factor fibroblástico básico de crecimiento (bFGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) han podido ser identificados expresándose de forma constante y predecible en diferentes fases del proceso de cicatrización del manguito rotador¹⁰⁴. Por ello, numerosos autores han intentado mejorar las propiedades del área de cicatrización mediante su aplicación en las diferentes fases. La utilización de estos factores de crecimiento se suele hacer en conjunto con algún vehículo como pueden ser suturas recubiertas, geles de fibrina o alginato cálcico, esponjas de colágeno u otros tejidos diseñados para servir como andamiaje para la reparación^{105,106,107}.

En un modelo de reparación del tendón supraespinoso en ovejas, Rodeo y cols. utilizaron proteínas morfogenéticas obtenidas de la cortical ósea: BMP-2 a 7, TGF β 1, TGF β 2, TGF- β 3 y FGF utilizando como andamiaje un vehículo de colágeno tipo I¹⁰⁵. Encontraron una mayor formación de cartílago y fibrocartílago en el sitio de la reparación que se correspondía con una mayor resistencia en la célula de carga. Otros estudios realizados con proteína morfogenética recombinante humana BMP-12¹⁰⁸, BMP-13¹⁰⁹ y BMP-14¹¹⁰ y FGFb⁸⁴ han proporcionado resultados similares. Kovacevic y cols. utilizaron una matriz de fosfato cálcico asociada a TGF β - 3 en un modelo de reparación de manguito rotador demostrando mayor resistencia de la reparación a las 4 semanas¹⁰⁶. Algunos factores de crecimiento han sido utilizados con éxito para el tratamiento de tendinopatías y reparaciones tendinosas: VEGF, el factor de crecimiento y diferenciación 5 (GDF-5), PDGFb e IGF1. El PDGFb está relacionado con muchos procesos responsables de estimular y acelerar la cicatrización tisular como son la quimiotaxis y proliferación de los fibroblastos, la inducción de formación de la matriz extracelular (fibronectina) y la inducción de síntesis de DNA y la revascularización. El IGF-1 también promueve la cicatrización mediante la estimulación de la síntesis de colágeno, DNA y glucosaminoglucanos¹¹¹. Además se ha demostrado la capacidad para disminuir la inflamación local en el sitio de la reparación. Aunque el VEGF aún no se ha utilizado en manguito rotador de humanos, Dines y cols⁹⁷. han estudiado el efecto de PDGFb e IGF1 en un modelo animal con ratas. Para ello, aislaron fibroblastos de tendón que fueron modificados genéticamente mediante retrovirus para aumentar la expresión de estos factores de crecimiento. Después fueron cultivados en una matriz bio-absorbible de ácido poliglicólico. Compararon los siguientes grupos: sutura con matriz, sutura con matriz modificada para PDGFb y sutura con matriz modificada para IGF1. Aunque desde un punto de

vista histológico ambos tratamientos experimentales provocaban una mejor cicatrización, biomecánicamente sólo se observaron resultados estadísticamente significativos en el grupo tratado con IGF1.

3.5 Plasma rico en plaquetas (PRP) o gel de plaquetas

Las plaquetas contienen numerosas citoquinas que son importante en las fases precoces de la cicatrización tisular: TGFb, bFGF, PDGF, VEGF e IGF-1 y 2¹¹². Cuando estas se activan, ocurre la degranulación de los gránulos alfa, produciéndose la liberación de los factores ya mencionados. El PRP es un preparado que contiene altas concentraciones de plaquetas, así como plasma y otros factores de crecimiento que están también implicados en la cicatrización de heridas. También contiene trombina, que presenta inherentes propiedades adhesivas y biológicas¹¹³. El preparado se obtiene a partir de sangre autóloga, mediante centrifugación, proporcionando una matriz densa de fibrina que puede depositarse en la zona de reparación. Dentro de las posibles funciones del PRP se encuentran: actuar como “pegamento” biológico, favorecer la coagulación y la hemostasis, favorecer la cicatrización de las heridas, restaurar el ácido hialurónico intrarticular, equilibrar la angiogénesis articular, aumentar la síntesis de glucosaminoglucanos y matriz cartilaginosa por parte de los condrocitos y servir como soporte celular en la migración y diferenciación¹¹⁴. Además son conocidas sus funciones analgésicas, antibacterianas y antiinflamatorias. En cuanto al aparato locomotor, se han descrito numerosas aplicaciones relacionadas en su mayoría con la recuperación precoz en lesiones musculares, ligamentosas, tendinosas o cartilaginosas con resultados controvertidos que se achacan a la heterogeneidad de los diseños de los estudios y a la variabilidad entre los diferentes preparados de PRP^{115,116}. Se ha aplicado en patologías crónicas como la epicondilitis

lateral, la tendinitis rotuliana, tendinitis aquílea y en patologías agudas como roturas del tendón de Aquiles o roturas musculares con resultados variables¹¹⁷. Parece que también podrían tener un efecto beneficioso en los defectos osteocondrales, en la osteocondritis disecante o en las reconstrucciones de ligamento cruzado en la rodilla¹¹⁴. Su uso más extendido ha sido en la epicondilitis, con resultados aparentemente esperanzadores¹¹⁸. Sin embargo, recientemente se han publicado meta-análisis como el de Ahmad y cols. en el que a pesar de apreciarse aparente beneficio a favor del uso de PRP frente a corticoides, los autores recomiendan estudios a mayor largo plazo y con mayor homogeneidad en el método de preparación¹¹⁹.

En cuanto a su aplicación en el manguito rotador, los resultados obtenidos también son dispares. Sánchez Márquez y cols¹²⁰., en un estudio realizado en roturas masivas del manguito rotador no encontraron diferencias clínicas ni disminución en el número de re-roturas. Otro grupo español, Ruiz-Moneo y cols., en un ensayo clínico aleatorizado y doble ciego, tampoco encontraron ventajas en la reparación del manguito rotador tras la aplicación de plasma rico en factores de crecimiento plaquetarios (lo que denominan PRP puro)¹²¹. Sin embargo, otros autores defienden la utilización de PRP en casos seleccionados. Sánchez y cols., grupo con amplia experiencia en la utilización de PRP, atribuyen el fracaso del grupo anterior a la deficiente preparación de la infiltración¹²². Randelli y cols¹²³., en un estudio prospectivo y aleatorizado aplicaron PRP en roturas no masivas encontrando menor dolor postoperatorio y una aceleración en el proceso de cicatrización en los pacientes del grupo con PRP. Sin embargo, no hubo diferencias en las escalas funcionales al año y a los 2 años de seguimiento ni en la tasa de re-rotura, que fue del 14 % versus el 37% en el grupo control. Por el contrario, Gumina y cols¹²⁴., en un estudio en el que aplicaban una membrana leucocitaria de PRP en la huella anatómica, encontraron

menor índice de re-roturas y mejores características de la cicatrización sin que este hecho suponga una mejor función y movilidad del hombro. Debido a la naturaleza crónica de este tipo de lesiones, autores con gran experiencia en el uso de PRP recomiendan la realización de aplicaciones seriadas, ya que, como se mencionó anteriormente, el efecto del plasma es limitado en el tiempo¹²⁵. La controversia en cuanto al uso de PRP se ha puesto de manifiesto recientemente en la última revisión de Cochrane en la que afirman que no existe evidencia científica suficiente para recomendar su utilización en ninguna de las mencionadas patologías, incluyendo el manguito rotador¹¹⁷.

3.6 Terapia génica

La expresión de los factores de crecimiento cuando se aplican localmente es efímera y eso limita la utilidad que pudiera tener en la reparación del manguito rotador. La terapia génica se basa en modificar las células de forma que expresen de forma continua genes que produzcan esos factores de crecimiento deseados¹²⁶. La terapia génica *in vivo* utiliza virus recombinantes o plásmidos de DNA que codifican para esos factores de crecimiento mientras que la terapia génica *ex vivo* consiste en modificar genéticamente células para que expresen la información deseada y después reintroducirlas en el lugar de la lesión. Así, en el manguito rotador, consiste en cultivar y expandir células autólogas transducidas con virus. Es un proceso más laborioso pero permite comprobar que la expresión del factor está teniendo lugar y además permite detectar posibles anormalidades en la célula antes de reimplantarla¹²⁷. También se ha descrito la utilización de oligodeoxinucleótidos antisentido (ODNs) con este fin para evitar los posibles riesgos de la terapia viral¹²⁸. Estas técnicas aún no han tenido aplicación en seres humanos.

3.7 Factores de transcripción

Se basa en la utilización de proteínas que se expresan en las fases embrionarias de formación de la entesis mediante la utilización de los genes que las codifican, por ejemplo el gen scleraxis^{73,129}. Otro tipo de proteína sintetizada por los tenocitos es la tenomodulina, una glucoproteína de membrana tipo 2 que parece promover la proliferación celular y la maduración de las fibras de colágeno y que está relacionada con el gen scleraxis¹³⁰.

3.8 Terapia celular

Se define como el trasplante de células vivas con fines terapéuticos¹³¹. Las células troncales, especialmente las mesenquimales, poseen un gran potencial para favorecer la reparación tisular de origen mesodérmico, migrando a la zona dañada. Se diferencian en células maduras de distintas estirpes tras recibir los estímulos adecuados y secretan factores de crecimiento e interleuquinas que favorecen la reparación de los tejidos, modulan la inflamación y generan un microambiente inmuno-privilegiado.

4. Terapia celular

4.1 Definición de célula troncal

Se considera célula troncal a aquella célula indiferenciada que posee dos características: capacidad de autorregeneración y capacidad para formar células maduras diferenciadas de diferentes estirpes celulares¹³². Son células con capacidad de división asimétrica, es decir, producen una copia exacta de sí mismas y otra célula con capacidad de realizar una función más especializada¹³³. Se clasifican en función de su potencialidad:

- a) Células troncales totipotenciales: son las células madre más primitivas, capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario. Sólo se encuentran en el cigoto y su evolución hasta mórula.
- b) Células troncales pluripotenciales: son capaces de diferenciarse en células de cualquier tejido del organismo adulto que se origine en las tres capas embrionarias: endodermo, ectodermo y mesodermo. No son capaces de diferenciarse en células germinales. Se encuentran principalmente en la masa interna del blastocisto.
- c) Células troncales multipotenciales: pueden diferenciarse únicamente en células de su misma capa embrionaria. Se están encontrando en todos los tejidos adultos, destacando la médula ósea, la sangre y la fracción estromal del tejido adiposo.
- d) Células unipotenciales: pueden dividirse únicamente a células idénticas a ellas mismas.

Las células troncales embrionarias, las más conocidas, son las que están presentes en la capa interna del blastocisto del embrión, gónadas sexuales y en los teratomas adultos. Las células troncales adultas son las que se encuentran en los diferentes tejidos del organismo adulto formando pequeños nichos. Aunque inicialmente se pensaba que era células multipotenciales, estudios posteriores demostraron que algunas de ellas tienen la capacidad de diferenciarse en células mesodérmicas, endodérmicas y ectodérmicas, al menos *in vitro*. Hoy en día se acepta la existencia de células que cumplen ambas premisas en casi todos o todos los órganos de los individuos adultos. La función de estas células parece estar relacionada con la renovación de las células que mueren en los tejidos adultos, así como con la

reparación de pequeñas lesiones que se producen constantemente en los órganos adultos¹³⁴.

4.2 Definición de terapia celular

Gimble y cols¹³². definieron que para que un tipo de célula troncal pueda ser utilizado en medicina regenerativa ésta debe cumplir una serie de criterios que son:

1. Estar presente en cantidad abundante (millones o billones de células).
2. Que la obtención se realice mediante un procedimiento mínimamente invasivo.
3. Que su diferenciación a otras líneas celulares sea un proceso regulable y reproducible.
4. Que puedan ser trasplantadas a un huésped autólogo o alogénico de una forma segura.
5. Que su proceso de manufactura cumpla con la legislación internacional al respecto.

Dentro del grupo de células progenitoras, las más utilizadas en estudios experimentales y clínicos son las células mesenquimales procedentes del estroma de médula ósea^{133,135}. El sistema hematopoyético del hueso es un órgano altamente proliferativo que contiene células madre hematopoyéticas pero también células madre no hematopoyéticas en el estroma que constituyen un grupo denominado células madre mesenquimales (MSC) o células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSC). Las células mesenquimales fueron descritas por primera vez por Friedenstein en 1976 a partir de extractos de médula ósea adulta; las describió como

unas células que se adherían al plástico, capaces de ser cultivadas durante tiempo indefinido sin modificar su fenotipo y que se podían diferenciar en células de tejidos mesodérmicos como hueso, cartílago, músculo, tendón, grasa y estroma medular¹³⁶. Después, numerosos autores han comprobado que, al menos *in vitro* se pueden diferenciar a células de tejidos derivados de otras láminas embrionarias, presentando marcadores y morfología típica de cardiomioblastos, neuronas o astrocitos e incluso células hepáticas¹³⁷. Se ha demostrado también que migran hacia los tejidos periféricos y contribuyen a la reparación tisular. Por ello, pueden obtenerse de sangre periférica mediante un proceso de aféresis.

El término célula madre mesenquimal o célula troncal mesenquimal hace referencia, por tanto, al tipo de célula que tiene la capacidad de proliferar y diferenciarse en progenitores de los diferentes tejidos mesenquimales¹³³. Sin embargo, para que una de estas células sea considerada progenitora, durante su cultivo *in vitro* debe cumplir tres requisitos. El primero de ellos es la capacidad de autorrenovación, es decir, cuando una célula progenitora mesenquimal se divide, al menos una de las células resultantes debe ser idéntica a la célula de la que procede, si bien en algunos casos ambas células hijas son idénticas a la célula de origen. El segundo de ellos es la capacidad de diferenciarse a células de distintas estirpes mesoteliales (osteocito, condrocito, adipocito) y, por último, la existencia de los siguientes marcadores de membrana: CD9, CD29, CD44, CD51, CD59, CD90, CD105, HLA 1, D7-FIB, y la ausencia de: CD34, CD133, HLA-DR (138). Al carecer de expresión molecular del complejo mayor de histocompatibilidad II son hipoinmunogénicas, lo cual permite su uso alogénico.

El mecanismo exacto por el que estas células troncales tienen la capacidad potencial de diferenciación no es del todo conocido aunque parece que podría ser debido al

proceso conocido como transdiferenciación. Existen dos teorías para explicar este fenómeno:

- Teoría de la fusión entre las células troncales adultas y células del ambiente en el que se encuentran¹³⁹. Cuando se cultivan células troncales adultas con células troncales embrionarias, algunas de ellas se fusionan y de la misma manera, cuando se cultivan con células del receptor, se fusionan con ellas, apareciendo nuevas células con una mezcla del citoplasma de ambas.
- Teoría que defiende que es el microambiente en el que se encuentran las células el que promueve la diferenciación a una determinada estirpe celular¹⁴⁰. Este concepto se basa en el proceso de la hematopoyesis, en el que la proliferación y diferenciación de las células progenitoras depende de factores secretados por las células presentes en el medio.

Aunque no se conoce muy bien, parece que la capacidad de diferenciarse es individuo-dependiente. Algunos autores sugieren que la edad del donante podría ser un factor limitante, siendo la capacidad de diferenciación inversamente proporcional a la edad¹³⁶.

Durante la última década se han encontrado células similares a las BM-MSC en otros órganos adultos como el tejido adiposo, en la pulpa dental, en la sangre del cordón umbilical, en tejidos fetales, tejido placentario, líquido amniótico, tejido sinovial, músculo o tendón entre otros¹⁴¹. Las más utilizadas, junto con las del origen de la médula ósea, son las células troncales mesenquimales derivadas del tejido graso, que serán tratadas ampliamente a continuación, pero también otras estirpes celulares han comenzado a utilizarse en diferentes estudios experimentales. Las estirpes celulares más utilizadas son las siguientes:

- Las células troncales procedentes del tejido muscular son capaces de diferenciarse en varios linajes celulares, reproducirse y regenerar hueso, cartílago, músculo, células sanguíneas y músculo cardíaco¹⁴². Se obtienen mediante biopsia y se aíslan mediante un procedimiento que se basa en su característica adhesión a matrices recubiertas de colágeno¹²⁷.
- Las células troncales derivadas del tejido sinovial (SMSCs) también constituyen una opción importante para el tratamiento de las enfermedades musculoesqueléticas ya que pueden ser utilizadas en músculo, hueso y tendón¹⁴³. Fueron aisladas por primera vez en 2001 y recientes estudios experimentales en tendón de Aquiles en conejos detectaron un mejor proceso de cicatrización con mayor cantidad de colágeno y mejor orientación de sus fibras¹⁴⁴.
- Las células troncales derivadas de tenocitos (TSPCs) se han aislado de cultivos de tendones humanos, de ratón, conejo y rata¹⁴⁵. Se ha demostrado que pueden diferenciarse, crear tejido similar al tendón y que tienen capacidad para sintetizar matriz extracelular. Su origen es interesante ya que algunos investigadores han indicado que las paredes de los vasos sanguíneos podrían almacenar progenitores musculares, pericitos y células mioepiteliales¹²⁸.

Recientemente, las células mesenquimales han sido modificadas genéticamente para expresar diferentes genes o producir diferentes factores de crecimiento y morfoproteínas. Actualmente existen grupos de investigación utilizando MSC modificadas genéticamente para producir BMP-2 en el tratamiento de defectos óseos en el fémur¹⁴⁶ o su aplicación en el manguito rotador tras modificarlas para la expresión del gen scleraxis¹³⁰.

4.3 Células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo

En 1964 Rodbell y cols. describieron por primera vez el método para aislar las células del tejido adiposo¹⁴⁷. El tejido graso procedente de rata se lavaba para eliminar las células hematopoyéticas, se incubaba con colagenasa tipo I en pequeños fragmentos y después de la digestión, se centrifugaba. Entonces se separaba la población flotante de células grasas maduras de la porción estromal vascular sedimentada (SVF). Este sedimento estaba formado por una población celular heterogénea que incluía células circulantes sanguíneas, fibroblastos, pericitos, células endoteliales y lo que se denominó “pre-adipocitos o progenitores de los adipocitos”. Este proceso fue modificado posteriormente por varios grupos de investigación hasta que estos pre-adipocitos fueron caracterizados como células madre mesenquimales. Las fases del mismo serían: aislamiento, cultivo y expansión¹⁴⁸(Figura 19).

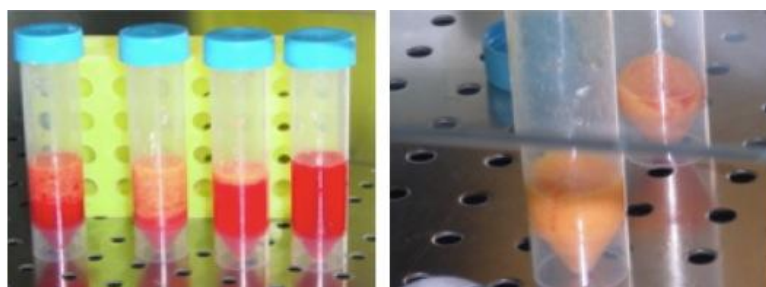


Figura 19. Imágenes correspondientes a tejido adiposo extraído para la obtención de CMDL en dos fases diferentes.

La nomenclatura para referirse al producto de la digestión del tejido adiposo mediante colagenasa es amplia. En la literatura pueden aparecer citados los siguientes nombres: células estromales derivadas de la grasa, células madre derivadas de la grasa, células adiposas estromales, células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo, lipoblastos o pre-adipocitos¹⁴⁹. El término aceptado internacionalmente y recomendado por la *Sociedad internacional de Tecnología del Tejido Adiposo* es el de Células Troncales Mesenquimales Derivadas del Tejido Adiposo (En inglés, ASC y

en castellano en este trabajo, CMDL). El perfil de marcadores celulares de membrana es similar al de las MSCs de médula ósea pero carecen los marcadores de células hematopoyéticas CD45 y CD14. Ambas células expresan CD29, CD44, CD71, CD90 y CD105/SH2 y SH3, que junto con SH2 se considera un marcador para MSCs¹³³. Además de estos marcadores, ambas expresan STRO-1, que es un marcador aislado en los progenitores multilinaje de médula ósea. Por el contrario, no se aprecia expresión de CD31, CD34 ni CD45. En resumen podría decirse que las CMDL presentan el siguiente fenotipo molecular¹⁵⁰: positividad para CD9, CD10, CD13, CD44, CD29, CD49d, CD49e, CD54, CD55, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, HLA-I, Fibronectina, Endomucina, ASMA (Alfa actina específica de músculo liso, del inglés, *smooth muscle cell-specific alpha actin*), Vimentina y colágeno tipo I; y negatividad para CD11b, CD19, CD31, CD34, CD79, CD45, CD79alfa, CD80, CD117, CD 144, HLA-DR, c-Kit, HLA-DR, MyD88, STRO-1 y lin.

La diferenciación a adipocito es un proceso complejo mediante el cual se producen una serie de cambios morfológicos que dependen de la actividad hormonal y de la expresión genética. Debido a su multipotencialidad, si se exponen a los factores ambientales adecuados, ya sean mecánicos o químicos, pueden dar lugar a otras líneas celulares¹⁴⁹. Estos procesos de diferenciación han sido ampliamente estudiados y definidos mediante protocolos reproducibles en condiciones controladas de laboratorio. Por ejemplo, se sabe que la diferenciación condrogénica puede ser inducida mediante baja tensión de oxígeno o factores de crecimiento como BMP6¹⁵¹.

La multipotencialidad *in vitro* de las CMDL ha sido demostrada en numerosos trabajos¹⁵². Debido a su origen mesodérmico, son capaces de diferenciarse en células de la línea adipogénica¹⁵³, osteogénica¹⁵⁴, condrogénica¹⁵¹ y miogénica (músculo esquelético¹⁵⁵, liso¹⁵⁶ y miocardiocitos¹⁵⁷). Al igual que las células troncales

mesenquimales derivadas de médula ósea, las CMDL pueden diferenciarse en líneas celulares mesodérmicas, endodérmicas y ectodérmicas: células endoteliales¹⁵⁸, células epiteliales¹⁵⁹, hepatocitos¹⁶⁰, células pancreáticas¹⁶¹ y células del sistema nervioso¹⁶².

También se han realizado estudios de diferenciación celular de las CMDL *in vivo* utilizando diferentes soportes para las células. Se ha demostrado la capacidad de diferenciarse en adipocitos utilizando como soporte ácido láctico poliglicólico, esponjas de colágeno o geles de fibrina^{163,164}. Esta diferenciación se ha demostrado mediante la morfología macroscópica, histología e inmunohistoquímica¹⁶⁵. Mizuno y cols., en un estudio con ratones transgénicos detectaron la presencia de tejido graso tridimensional a las 8 semanas de la implantación y comprobaron mediante inmunofluorescencia que estaba formado por las CMDL que habían sido implantadas¹⁶⁶. Otros modelos animales han demostrado *in vivo* que la administración intravenosa o intramuscular de CMDL aumentaba de forma importante la vascularización local. Este fenómeno se relaciona de forma directa con el hecho de que se diferencian a células del endotelio vascular y de forma indirecta, con la secreción de factores de crecimiento angiogénicos por parte de las CMDL. Lu y cols. demostraron así mismo una mayor supervivencia de flaps cutáneos disminuyendo la isquemia local al administrar localmente CMDL¹⁶⁷. La administración tópica de CMDL en úlceras cutáneas puede acelerar el proceso de cicatrización de las heridas. Nambu y cols. demostraron una mayor presencia de tejido de granulación y mejor vascularización cuando comparaban la palicación de esponjas de colágeno con y sin CMDL en úlceras quimioinducidas¹⁶⁸. Otro estudio en úlceras en ratones diabéticos confirmó estos resultados¹⁶⁹. También se ha descrito la capacidad de regenerar tejido periodontal¹⁷⁰, hueso craneal¹⁷¹, condrocitos articulares¹⁷² y músculo cardíaco¹⁷³ entre otros. Ruiz Ibán y cols. realizaron un estudio en suturas meniscales en conejos en el

que realizaban roturas en la zona avascular del mismo y se aplicaban CMDL. Apreciaron mejor cicatrización, aunque esta era más evidente en los casos en los que la rotura se realizó de forma precoz y no a las 3 semanas¹⁷⁴. En cuanto al manguito rotador, recientemente Oh y cols. han realizado un estudio en conejos en el que el tendón estudiado era el subescapular¹⁶⁴. Se realizaba una comparación entre cuatro grupos: aplicación de suero salino y reparación; aplicación de suero salino con aplicación de CDML; aplicación de CMDL y reparación y un grupo control. Se evaluaron parámetros biomecánicos, electrofisiológicos e histológicos, incluyendo la degeneración grasa del tendón. Estos investigadores demostraron que existía mejor capacidad de cicatrización así como disminución de la degeneración grasa en los animales a los que se administró CMDL.

En los últimos años, con la expansión de la aplicación clínica de las células mesenquimales derivadas del tejido adiposo, se ha demostrado que el proceso de diferenciación también podría estar influenciado por los vehículos que se utilicen para depositarlas y que su comportamiento es distinto al de las células troncales mesenquimales implantadas sin vehículo. Se han descrito dos tipos de interacciones: bioquímicas, a través de los receptores de membrana, y físicas, por la disposición que adopten las células en ellos. Por ejemplo, los vehículos que mantienen la forma fisiológica redondeada de las células y limitan el contacto entre ellas, como el alginato o la agarosa, promueven una diferenciación condrogénica y evitan la expresión de colágeno tipo I. Los vehículos porosos de gelatina o los que utilizan fibrina, promueven también la diferenciación condrogénica, pero inducen la expresión de colágeno tipo I y II por lo que favorecen un fenotipo fibrocartilaginoso¹⁴⁹.

4.4 Aplicación clínica de la terapia celular

Las terapias basadas en células troncales para la reparación y regeneración de diferentes tejidos y órganos constituyen un modelo esperanzador para el tratamiento de muchas enfermedades, aunque actualmente sólo hay 4 aplicaciones que se consideran no experimentales: transplantes de progenitores de médula ósea, transplante autólogo de condrocitos, transplante de células limbares y transplante de queratinocitos para grandes quemados. Las células troncales embrionarias presentan ciertas limitaciones relacionadas con la obtención de un número suficiente, la manipulación genética, su capacidad teratogénica y las consideraciones éticas. Las células troncales adultas son más accesibles y carecen, al menos algunas de ellas, de problemas inmunogénicos y éticos. Desde el año 2003, en España, las células somáticas manipuladas ex vivo se consideran medicamentos de terapia celular somática y por ello deben cumplir las normas de correcta fabricación (Directiva 2003/63/CE y Orden SCO 3461/2003). Entre otros requisitos se destaca que deben ser procesadas en laboratorios acreditados por la Agencia Española del Medicamento para la fabricación de medicamentos de terapia celular somática en fase de investigación clínica. Recientemente, el 4 de Septiembre de 2013, se han publicado directrices de la agencia española de medicamentos y productos sanitarios sobre la nomenclatura de las sustancias activas en investigación de terapia avanzada que contengan células (www.aemps.gob.es/investigacionClinica/terapiasAvanzadas).

Tras la experimentación in vitro e in vivo con las CMDL y comprobar su capacidad de diferenciación y los efectos beneficiosos en los procesos de cicatrización y angiogénesis, ésta ha sido trasladada a numerosos campos clínicos. La primera utilización clínica de CMDL autólogas fue para el tratamiento de defectos óseos

craneales en 2004. Una niña de 7 años con un defecto óseo calvario post-traumático fue tratada con injerto de hueso esponjoso autólogo de cresta ilíaca combinado con CMDL, gel de fibrina y una matriz biodegradable. Posteriormente, mediante escáner, se comprobó la formación de tejido óseo y la ausencia de solución de continuidad en el defecto¹⁷¹. Debido a su capacidad para diferenciarse en tejido adiposo se han utilizado para reconstrucciones mamarias tras resecciones tumorales, asimetrías mamarias, defectos subdérmicos postquirúrgicos o quemaduras en esta región¹⁶⁵. Se realiza una transferencia de estas células junto con una muestra de grasa libre en un proceso denominado lipotransferencia asistida por células (LAC) y éstas contribuyen al mantenimiento del volumen de grasa transplantado. En Cardiología, las MSCs se han utilizado para regeneración de músculo cardíaco, para mejorar la función muscular después de un infarto agudo o en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica¹⁷⁵. Actualmente en Europa se están desarrollando ensayos clínicos con CMDL con el mismo fin en el que intervienen 9 países de la Unión Europea con el objetivo de demostrar su eficacia. También se han utilizado de forma efectiva en el tratamiento de enfermedades isquémicas debido a su capacidad para provocar neovascularización¹⁷⁶. En Endocrinología se han utilizado en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 para generar células productoras de insulina, glucagón y somatostatina¹⁷⁷. En las enfermedades hepáticas como fallo hepático agudo, enfermedades metabólicas o cirrosis, las células troncales se administran a través de la vena porta o de la arteria mesentérica inferior¹⁷⁸. También se investiga su posible papel en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica, así como en el infarto cerebral o en las lesiones de nervios periféricos. En estudios experimentales con ratas se ha demostrado la capacidad de mejorar la capacidad de cicatrización en lesiones del

nervio ciático¹⁷⁹. Debido a sus propiedades inmunosupresoras¹⁸⁰, las CMDL pueden utilizarse en el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped (EICH). Yañez y cols. realizaron un ensayo clínico en el que las CMDL eran administradas de forma intravenosa en pacientes que presentaban EICH aguda refractaria al tratamiento con corticoesteroides. La enfermedad se curó de forma completa en 5 de los 6 pacientes y 4 de ellos completaron un seguimiento medio de 40 meses sin presentar efectos secundarios¹⁸¹. En Cirugía Plástica y Reconstructiva y Cirugía Maxilofacial se han utilizado para reconstrucciones de nariz y oreja y tejido periodontal¹⁷⁰. El potencial terapéutico de las CMDL para la cicatrización de las heridas demostrado en estudios experimentales ha sido utilizado para el tratamiento de úlceras crónicas causadas por tratamientos de radioterapia. Rigotti y cols. inyectaron CMDL en 20 pacientes con secuelas de radioterapia tras sufrir cáncer de mama, con severos síntomas y daño funcional, obteniendo remisión de los síntomas en todos los pacientes¹⁸².

Una de las aplicaciones clínicas mejor estudiadas es la utilización de las CMDL para el tratamiento de las fístulas crónicas en la Enfermedad de Crohn¹⁸³. El laboratorio de Terapia Celular del Hospital Universitario de La Paz en Madrid es pionero en la aplicación de CMDL. García Olmo y cols. han realizado ensayos clínico implantando células troncales autólogas y alogénicas en pacientes que presentaban fístulas complejas perianales, rectovaginales y en el tracto respiratorio superior¹⁸⁴. En el primer ensayo (Fase I) se incluyeron 4 pacientes con Enfermedad de Crohn con fístulas complejas refractarias al tratamiento médico y quirúrgico, presentes al menos durante un período de 5 años. Se consideró curación cuando se detectó re-epitelización total del orificio fistuloso externo. El tratamiento fue eficaz en 6 de las 8 fístulas tratadas y en las 2 restantes se apreció un cierre parcial. Así mismo, se demostró la seguridad de la utilización de la terapia celular en humanos con patología

fistulosa. En el ensayo multicéntrico en fase II se incluyeron 50 pacientes con patología fistulosa de diferentes orígenes y se comparó la utilización de un adhesivo tisular de fibrina asociado a CMDL frente al adhesivo únicamente. Se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la cicatrización fistulosa a favor de la utilización de CMDL. No se encontraron diferencias significativas en la cicatrización de las fístulas en función del origen de las mismas. Actualmente se ha finalizado un Ensayo Clínico en fase III para el tratamiento de fístulas complejas no relacionadas con la Enfermedad de Crohn con la participación de tres países de la Unión Europea. Varios ensayos clínicos se están desarrollando en este momento: un ensayo clínico en fase III para el tratamiento de fístulas complejas relacionadas con la Enfermedad de Crohn y un ensayo clínico en fase II para el tratamiento de fístulas traqueoesofágicas¹⁸⁵. También se han desarrollado numerosos proyectos de tesis doctorales basados en la utilización de CMDL. Se han empleado biosuturas con CMDL para anastomosis traqueales, cólicas y en tendón de Aquiles. El uso de CDML en forma de biosuturas en la reparación del tendón de Aquiles, demostró una disminución del fenómeno inflamatorio y de la cantidad de adherencias, sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas en la resistencia de la misma en un ensayo a tracción¹⁸⁶.

4.5 Terapia Celular aplicada a la reparación del manguito rotador

El resultado de la reparación quirúrgica del manguito rotador parece depender de la cicatrización que se produzca en la interfase hueso-tendón. La entesis, tejido específico de transición que constituye la inserción nativa del manguito rotador, no se regenera tras la rotura y reparación. En su lugar encontramos un tejido cicatricial fibrovascular cuyas propiedades mecánicas son inferiores a las de la entesis nativa.

El modelo de cicatrización hueso-tendón más estudiado es el que reproduce la integración de los injertos tendinosos utilizados en la reparación de las lesiones del ligamento cruzado anterior de la rodilla mediante túneles óseos. Lim y cols. utilizaron MSCs en un modelo animal con conejos similar a los descritos anteriormente. En este caso el estudio histológico reveló la presencia de células cartilaginosas a las 2 semanas y células del tejido óseo a las 8 semanas. En el estudio biomecánico no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos a las 2 y 4 semanas. Sin embargo, a las 8 semanas, el grupo tratado con MSCs presentaba un aumento significativo de la fuerza¹⁸⁷.

Tras los primeros estudios en tendón de Aquiles, tendón patelar y después en ligamento cruzado, se comenzaron a realizar trabajos en los que se aplicaba la terapia con células torcales al modelo de manguito rotador. Gulotta y cols. realizaron un estudio experimental con MSCs en ratas en el que realizaron una desinserción unilateral del tendón supraespinoso y lo repararon mediante sutura transósea. Demostraron que las MSCs estaban presentes en la zona de la reparación y eran metabólicamente activas. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos desde un punto de vista biomecánico ni histológico, a las 4 semanas se apreciaba mayor contenido en fibrocartilago y mejor orientación de las fibras de colágeno. Este mismo grupo de investigación ha utilizado recientemente MSCs modificadas utilizando terapia génica para que expresen el gen scleraxis y el factor tisular inhibidor de metaloproteasas (MIT1) con resultados prometedores^{126,188}. En nuestro laboratorio de investigación y como parte de esta misma línea experimental se han realizado diferentes modelos experimentales utilizando CMDL asociadas a un gel de fibrina de igual forma que en el trabajo de Gulotta y cols¹⁸⁸. y más recientemente CMDL asociadas a plasma rico en plaquetas¹⁸⁹.

A pesar de la escasez de estudios con animales, Ellera Gomes y cols. realizaron un trabajo en 14 pacientes con roturas completas del manguito rotador reparadas con puntos transóseos a través de una mini-incisión en el que se utilizaron células troncales mononucleares autólogas procedentes de aspirado de médula ósea de cresta ilíaca. En el seguimiento a 12 meses, se demostró la presencia de integridad del tendón mediante resonancia magnética en los 14 pacientes¹⁹⁰.

Actualmente existe escasa información relativa al uso de CMDL en seres humanos para la reparación del manguito rotador. Por una parte, son necesarios estudios de experimentación que confirmen la seguridad de esta terapia y en segundo lugar analizar el beneficio obtenido con su aplicación en las lesiones del manguito rotador.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

II. Hipótesis y objetivos del trabajo

Hipótesis

La utilización de células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo asociadas a un vehículo de colágeno en la reparación de la rotura del tendón supraespinoso en un modelo experimental en rata mejora las propiedades biomecánicas e histológicas de la región de cicatrización de la entesis.

Objetivos del trabajo

La finalidad de este trabajo es evaluar las propiedades biomecánicas y las características histológicas de la región de reparación de la entesis del tendón supraespinoso en un modelo experimental de rotura de manguito rotador tras aportar células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo asociadas a un vehículo de colágeno.

III. MATERIAL Y MÉTODO

III. Material y Método

1. Animal de experimentación y agrupamiento

Para el estudio de las uniones tendón-hueso del modelo de manguito rotador se emplearon un total de 50 ratas hembra Sprague-Dawley con un peso que oscilaba entre 280 y 330 gr y una edad de 8 semanas. Para la realización del estudio se obtuvo la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal y se siguieron todas las normas de la legislación internacional para la experimentación animal (86/609/CEE).

Dieciocho animales se destinaron para el estudio histológico y 32 para el estudio biomecánico. Los animales se estabularon antes de la intervención para su adaptación. Permanecieron siempre en jaulas con un total de 2 o 3 ratas por jaula para no estimular la actividad física; fueron alimentadas con una dieta estándar para la especie (Panlab S. L) y dispusieron de agua ad libitum. Tras la intervención volvieron a ser estabuladas en sus jaulas en las mismas condiciones hasta finalizar la experimentación.

2. Técnica quirúrgica

2.1 Material para la cirugía

Se empleó anestesia inhalatoria con Forane (Isoflurane) a distinto flujo para la fase de inducción anestésica (3l/min de gas por 1l/min de O₂) y para la fase de intervención quirúrgica 1,5l/min de gas /1,5l/min de O₂)

Para el procedimiento quirúrgico se empleó una caja de instrumental básico (porta agujas, pinzas con y sin dientes y tijera de hilos), bisturí desechable del número 15 para la incisión cutánea y del número 11 para el resto de la cirugía. Se utilizaron suero

salino fisiológico, gasas y povidona yodada. Los instrumentos se esterilizaron con calor y durante la intervención se mantuvieron en una solución de povidona yodada.

Las células, en los casos tratados, fueron resuspendidas en 50yL de suero fisiológico inmediatamente antes de su inyección en una jeringa de vidrio de 100yL (Hammilton). Se utilizó una estructura de soporte para evitar la dispersión o fuga de las células madre administradas. Se utilizó el trazador inmunofluorescente Dil para marcar las células en muestras correspondientes al estudio histológico.

Para la realización del túnel transóseo se utilizó una broca de 1 mm de diámetro. Para la sutura tendinosa se utilizó una sutura tipo monofilamento sintético no reabsorbible (polipropileno de 5/0) siguiendo un modelo extendido de reparación de manguito rotador en ratas⁸⁰. Para el cierre de la piel se utilizó una seda de 3/0, sutura trenzada no reabsorbible.

Para la fijación de la pieza al sistema de presas en el estudio biomecánico se utilizó cemento óseo, Polimetilmetacrilato (PMMA), CMW-Cement DePuy^R, Johnson&Johnson.

2.2 Método de obtención y expansión de las células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo (CMDL).

Se utilizaron células troncales mesenquimales del tejido celular graso de la rata que fueron obtenidas según el protocolo del laboratorio de Terapia Celular, similar al publicado para tejido humano por García-Olmo D, García-Arranz M, Gómez-García L y cols.¹⁹¹(Figura 20).

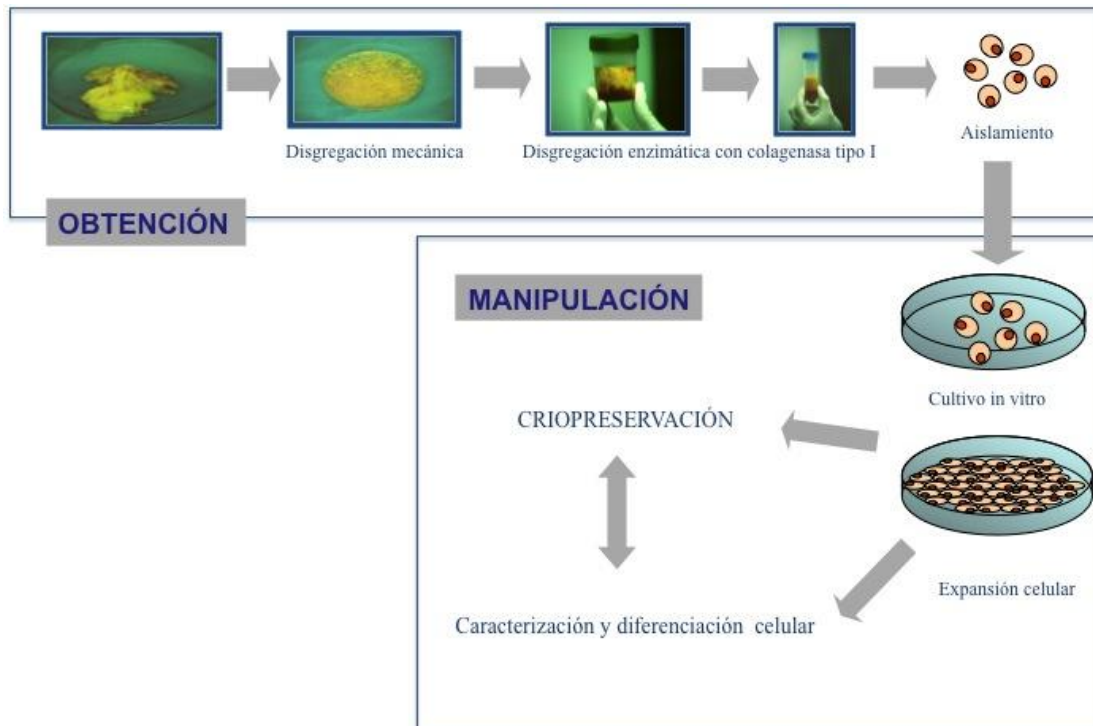


Figura 20. Resumen esquemático del proceso de obtención y manipulación de las células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo.

La obtención del tejido celular graso se realiza bajo anestesia general inhalatoria con Forane con las dosis mencionadas anteriormente. Durante el procedimiento se extrae tejido celular graso, principalmente abdominal e inguinal. Para ello, con un bisturí del 15 se abre el abdomen de la rata y con pinzas se va separando el tejido graso de las estructuras adyacentes. Una vez despegado de las estructuras mediante corte con tijeras se extrae el tejido graso y se incluye en suero fisiológico.

El segundo paso es el aislamiento de las CMDL del total del tejido obtenido. Este proceso se basa en separaciones por centrifugación, la utilización de la enzima collagenasa tipo I y en las propiedades de adherencia de las células a los plásticos de cultivo. Desde su primera descripción, ha sido modificado por numerosos grupos de estudio. El protocolo empleado en nuestro laboratorio de terapia celular ha sido estandarizado recientemente y se realiza en condiciones estériles dentro de una

campana de flujo laminar. El tejido graso se suspende en una solución salina antes de procesarlo y se lava abundantemente mediante cambios de la solución tampón salino fosfato (PBS). Se disgrega en pequeños fragmentos mediante cortes con tijera y/o bisturí y a continuación se lava con PBS para eliminar todos los restos no deseables del mismo. El tejido disgregado se centrifuga a 250 G durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se separan entonces el sobrenadante, que constituye la porción adiposa, y el sedimento, que contiene los restos celulares de las series blanca y roja. Este sobrenadante adiposo se digiere mediante la enzima collagenasa tipo I, previamente activada por calor, a una concentración de 0,075% durante 30 minutos a 37° C y en continua agitación. Una vez completada esta fase, la acción de la collagenasa se neutraliza mediante la adición de suero fetal bovino (FBS) en un volumen 2 veces superior a la concentración de collagenasa inicial. El producto de la digestión, una vez neutralizado, se somete a una segunda centrifugación a 300 G durante 10 minutos para separar de nuevo los restos celulares no deseables que son adipocitos principalmente. El precipitado se lava de nuevo con PBS y se resuspende, durante 10 minutos a temperatura ambiente, en una solución de NH_4Cl 0,16 M que provoca la lisis de los hematíes. A continuación se centrifuga por tercera vez, a 300 G durante 10 minutos y el precipitado se filtra por mallas de nylon de 70 μm , para eliminar los restos de tejido celular no disgregado. Posteriormente el producto filtrado se resuspende en un medio de cultivo específico: Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) con glucosa y piruvato, 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 1% de estreptomycin 10 micrometros/ml y penicilina 1 UI/ml. Este medio de cultivo será el utilizado a lo largo del estudio para los cultivos celulares. Este producto final es la llamada Fracción Vásculo Estromal (SVF, del inglés, Stromal Vascular Fraction).

Las células obtenidas de la SVF se siembran en placas de cultivo de 100 cm³, con una densidad de 50.000 células por cm² y se trasladan a un incubador con condiciones estándar para el cultivo celular (37° C, 90-95% de humedad relativa y 5% de CO₂). Transcurridas 24 horas y conocida la propiedad de adherencia de las células madre mesenquimales al plástico, se retira el sobrenadante de las placas de cultivo con las células no adheridas y éstas se lavan con PBS para retirar células muertas, restos celulares, adipocitos y células hemáticas, añadiendo de nuevo el medio de cultivo. Se pueden observar en los recipientes de cultivo numerosas células adheridas al plástico con formas fibroblásticas y de color grisáceo o negruzco frente a la luz blanca del microscopio invertido. Este proceso se repite cada 3 o 4 días hasta que las células llegan al 80-90% de confluencia. En este momento se retira el medio de cultivo y se lavan las placas con PBS. Las células se separan de la placa mediante tripsina/EDTA (ácido etilen-diamina-tetracético, Sigma) durante 3-5 minutos a 37° inhibiendo la acción de la tripsina con la adición de suero fetal bovino. Después se centrifuga a 300 G durante 10 minutos para eliminar la tripsina y el suero neutralizador.

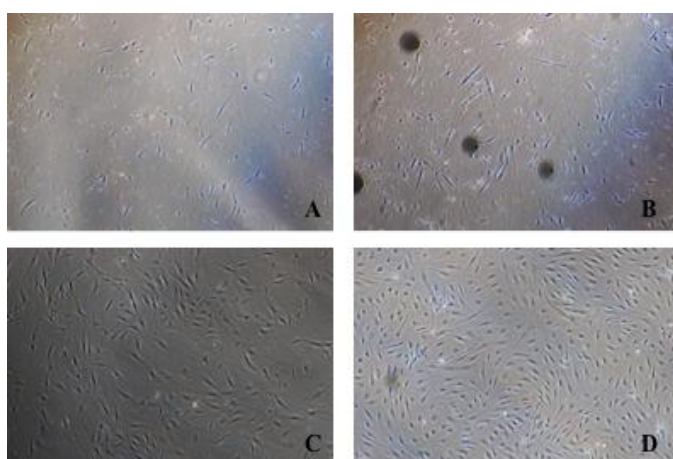


Figura 21. Fases del proceso de obtención celular. A) Disgregación: 2 horas; B) Disgregación: 4 horas; C) 8 días en cultivo; D) Cultivo subconfluyente

El proceso de expansión celular consiste en, una vez contadas las células en una cámara de Neubauer, sembrarlas en otras placas con el mismo medio de cultivo y densidad inicial, hasta obtener el número de células suficientes para llevar a cabo todos los experimentos previstos (Figura 21). Durante el proceso de expansión celular, algunas de las células se criopreservan en una solución de 10% de dimetilsulfóxido en suero fetal bovino y se almacenan en nitrógeno líquido hasta su uso. Se ha demostrado que pueden conservarse mediante este procedimiento, de forma indefinida, manteniendo su viabilidad y sus propiedades biológicas¹⁹². Aún no está claramente definido cuál es el límite de este proceso de expansión celular aunque algunos grupos de estudio han sugerido que las células son estables genética y fenotípicamente incluso tras multiplicar por 200 la población inicial¹⁹³. En el protocolo de este estudio las células fueron congeladas tras 10 pases celulares y fueron descongeladas previamente a su uso. La caracterización de las CMDL en función de los marcadores de membrana aprobados por la Federación Internacional para el tratamiento y ciencia del tejido adiposo (IFATS, del inglés, *International Federation for Adipose Therapeutics and Science*) es la siguiente¹⁵⁰:

- Positividad para al menos tres de los siguientes marcadores de membrana: CD9, CD44, CD49a, CD51, CD73, CD90, CD105.
- Negatividad para los siguientes marcadores de membrana: CD3, CD11b, CD14, CD34, CD45, CD54, CD133, CD79a, CD19 y HLA-DR.
- Diferenciación de las células “in vitro” a osteocitos, condrocitos y adipocitos.

Las células utilizadas en este estudio han sido caracterizadas, antes y después de la criopreservación, mediante citometría de flujo para los siguientes marcadores positivos: CD44, CD29, CD90 y CD105, y para los siguientes marcadores negativos:

CD 34 y CD11b. Además fueron diferenciadas tras su descongelación a osteocitos y adipocitos, para demostrar que no habían perdido la capacidad de diferenciación, según los siguientes protocolos:

a) Diferenciación a adipocito

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo y se mantuvieron en cultivo renovando el medio cada 3-4 días hasta llegar a confluencia. Tras varios días confluentes se indujo su diferenciación a adipocitos. El medio de cultivo adipogénico (medio de inducción) se componía de: DMEM-10 suplementado con isobutil-metilxantina 0,5 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU), dexametasona 1 μ M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU), insulina 10 μ M (Actrapid®, NovoNordisk A/S, Bagsværd, Dinamarca) e indometacina 200 μ M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU) durante 14 días, renovándolo cada 2 días. Posteriormente las células se cultivaron durante 4 días más con DMEM-10 suplementado sólo con insulina 10 μ M (medio de mantenimiento). Los controles negativos fueron CMDL cultivadas sólo con DMEM-10 durante el mismo periodo de tiempo. Tras fijar las células con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente, la acumulación de lípidos se visualizó mediante la tinción con Oil Red O (ORO) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU) al 0,3% en isopropanol al 60% durante 30 minutos en agitación suave. El exceso de colorante se eliminó mediante varios lavados con PBS.

b) Diferenciación a osteocito

Bajo las mismas condiciones de siembra que en el apartado anterior, las células confluentes fueron inducidas a diferenciarse a osteocitos mediante la incubación con medio osteogénico durante 28 días, renovando el 60% del volumen cada 3-4 días. La

composición del medio fue la siguiente: DMEM-10 suplementado con dexametasona 0,01 μ M, ascorbato-2-fosfato 50 μ M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU), y glicerofosfato 10 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU). El control negativo de diferenciación consistió en cultivar las células con DMEM-10 durante 28 días. Tras el periodo de incubación las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los depósitos ricos en calcio secretados por los osteocitos a la matriz extracelular se visualizaron mediante la tinción de Rojo de Alizarina S (ARS, del inglés, *Alizarin Red S*) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU). Las células fijadas se incubaron con ARS al 1% en agua destilada con pH de 4,1 durante 20 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad, con agitación suave. A continuación, el exceso de colorante se eliminó tras varios lavados con agua destilada.

2.3 Soporte de colágeno

Se utilizó como soporte para las CMDL una esponja de colágeno según el modelo descrito por Rodeo y cols¹⁰⁵. y Anderson y cols¹⁹⁴. con el fin de evitar la dispersión de las CMDL. Es una esponja absorbente, blanda, maleable y no friable esterilizada mediante óxido de etileno. Su origen es bovino y está desprovista de reacciones alérgicas o intolerancia. Suele integrarse con el tejido y reabsorberse en un plazo de 15 días.

2.4 Procedimiento quirúrgico

Todas las cirugías fueron realizadas por el autor. La asignación de los animales a cada grupo así como el lado que iba a ser intervenido se realizó de manera aleatoria. En los animales destinados al estudio biomecánico la cirugía fue unilateral, mientras que para los destinados al estudio histológico fue bilateral (Figura 22).

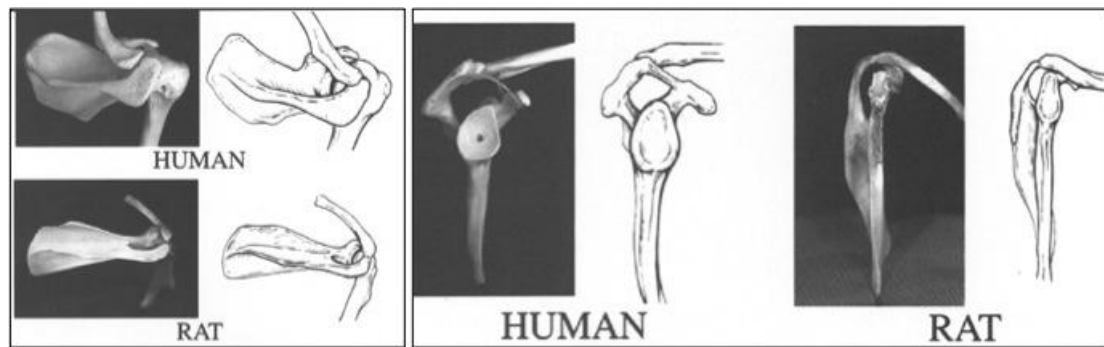


Figura 22. A) Fotografía y esquema de la anatomía ósea de un hombro derecho humano (*human*) y de rata (*rat*) en una vista posteroanterior, demostrando la similaridad del acromion proyectándose anteriormente sobre la cabeza humeral hasta la clavícula. **B)** Misma imagen de un hombro derecho desde una vista lateral habiendo retirado el húmero para demostrar la presencia de un arco coracoacromial sobre el espacio correspondiente al músculo y tendón supraespinoso (Soslowsky LJ. *J Shoulder Elbow Surg* 1996; 5:383-92).

No se estableció periodo previo de ayunas ni se realizó profilaxis antibiótica. Los animales fueron pesados antes de comenzar la cirugía y antes del sacrificio de los mismos. El procedimiento anestésico fue realizado mediante anestesia general inhalatoria. La inducción anestésica se realizó en cámara con Forane a 3L/min junto con oxígeno a 1,5 L/min. El mantenimiento anestésico se realizó con Forane a 1-1,5 L/min con el mismo flujo de oxígeno. Tras la anestesia, se realizó rasurado mecánico de la zona que iba a ser intervenida y limpieza de la misma con povidona yodada. Según recomendaciones veterinarias, el animal se colocó en todos los casos sobre manta térmica para evitar hipotermia durante la intervención y el postoperatorio inmediato.

El animal se colocó en decúbito lateral dejando expuesto el lado que iba a ser intervenido. En los momentos en los que se precisó tracción o rotación del miembro a intervenir, se realizó mediante la ayuda de soporte de esparadrapo. A continuación se practicó una incisión en la línea media de la región deltoidea del hombro de la rata, con bisturí desechable de hoja del número 15, de 2 centímetros de longitud aproximadamente. Se realizó la exposición del deltoides y un abordaje transversal a

3mm del borde lateral del acromion separando las fibras musculares. Tras disección roma de posibles adherencias bursales, se identificó y aisló el tendón supraespinoso. Mediante una broca de 1 mm de diámetro se realizó una perforación transversal en dirección anteroposterior a través de la porción más proximal del húmero y a través de ésta se realizó el paso intraóseo de una sutura monofilamento no reabsorbible de 5/0. Una vez identificado y aislado el tendón supraespinoso, el cabo posterior de esta sutura se introdujo a través del tendón con una técnica similar a la realización de un punto de Mason-Allen modificado⁶⁶. Posteriormente, el tendón supraespinoso se desinsertó de forma completa del húmero proximal mediante bisturí desechable de hoja del número 11 y se escarió la zona de inserción mediante el mismo bisturí, eliminando cualquier resto de fibrocartílago. Tras comprobar la solución de continuidad y movilizar el tendón, se procedió a la sutura inmediata del mismo mediante nudo según técnica habitual asegurando contacto con la región de la huella anatómica (Figura 23).

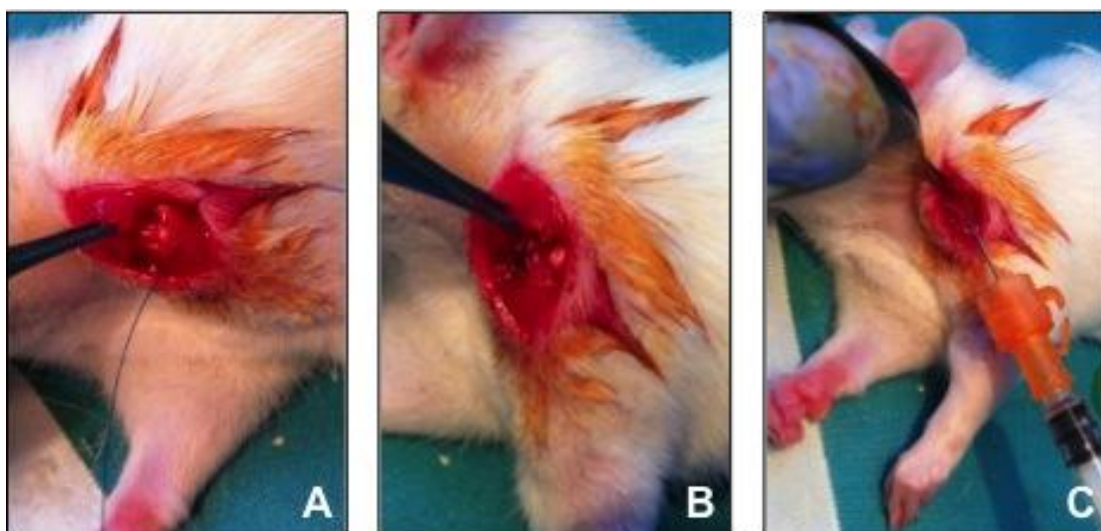


Figura 23. Imágenes correspondientes a detalles de la cirugía experimental; A) Paso de sutura transósea a través de metáfisis humeral; B) Sutura de tendón en huella anatómica; C) Aplicación de soporte de esponja e inyección de concentrado de células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo.

Se realizaron tres tipos de cirugía en el grupo destinado a estudio histológico y dos tipos de cirugía en el grupo destinado a estudio biomecánico, que son los siguientes:

1. Sutura únicamente (sólo en el grupo destinado a histología).
2. Sutura con aporte de esponja de colágeno reabsorbible. Un fragmento cuadrangular de 3mm de anchura por 3 mm de longitud fue depositada sobre la zona de la reparación.
3. Sutura con aporte de esponja reabsorbible e inyección de CMDL. Se realizó aporte de esponja como ha sido descrito anteriormente e inyección de 2 millones de CMDL disueltas en 50 yL de suero salino fisiológico en la zona reparada.

Se realizó cierre por planos, con al menos 4 puntos simples en el músculo deltoides para disminuir el riesgo de dehiscencia del mismo o pérdida de fuerza. La sutura cutánea se realizó mediante puntos simples con seda de 3/0 manteniendo cabos muy cortos para evitar riesgo de retirada de los puntos por el mismo animal y disminuir así el riesgo de infección.

Una vez concluido el procedimiento quirúrgico se suspendió el Forane y se mantuvo el oxígeno hasta el despertar del animal. En este intervalo de tiempo se administró una dosis de tramadol ajustada en función del peso de animal (5,10 mg de tramadol/kg de peso). Una vez que la rata comenzó a moverse, se trasladó a la jaula bajo una lámpara de calor. Se mantuvo un ayuno postoperatorio de al menos 6 horas. Posteriormente se depositó alimento en la parte inferior de la jaula para evitar desnutrición en las primeras fases de recuperación por la imposibilidad de alcanzarla en la parte superior de la misma. Se administró una dosis equivalente de analgesia cada 12 horas durante las primeras 48 horas postoperatorias.

3. Modelo experimental

3. 1 Estudio Biomecánico

La muestra para evaluación biomecánica estaba constituida por un total de 32 animales en los que se llevó a cabo una cirugía unilateral y fueron divididos en 2 grupos. En 16 animales se realizó sutura con aporte de esponja reabsorbible (grupo control) y en los otros 16, sutura, aporte de esponja e inyección de CMDL (grupo experimental). Cada uno de estos grupos se dividió en dos subgrupos en función del tiempo transcurrido entre la cirugía y el sacrificio siendo éstos 2 y 4 semanas.

3.1.1 Sacrificio y preparación de las muestras

Los animales fueron sacrificados mediante inyección intracardíaca de cloruro potásico 5M (CIK) a dosis letales a las 2 y 4 semanas, siendo anestesiados previamente con forane/O₂. Una vez sacrificados los animales, se procedió al examen inicial en fresco, para describir las características macroscópicas del área lesional. Posteriormente se realizó una amputación supracondílea humeral distal y una disociación escápulo-torácica y se extrajo una pieza completa en la que se encontraban incluidas la articulación glenohumeral y la escápula, con toda la musculatura periescapular incluyendo el deltoides como músculo más superficial. En segundo lugar se realizó una disección exhaustiva de la pieza hasta identificar y aislar los elementos óseos de la articulación glenohumeral, conservando escápula y húmero así como la parte más lateral de la clavícula. Se disecaron todos los tendones del manguito rotador eliminando el tendón y músculo subescapular así como el infraespinoso. La pieza final estaba constituida tan sólo por el tendón y músculo supraespinoso con los elementos óseos mencionados (Figura 24).



Figura 24. Imágenes correspondientes a la preparación de la muestra para el estudio biomecánico; A) Pieza obtenida tras la disección y exéresis del manguito rotador a excepción del tendón supraespinoso, que se aprecia cicatrizado con las suturas aún presentes; B) Vista medial de la muestra embebida en la jeringa con cemento; C) Vista anteroposterior de la muestra embebida en la jeringa con cemento.

Para la realización del protocolo biomecánico se realizaron ensayos previos de diferentes mecanismos de fijación del húmero de la pieza a la célula de carga. El método seleccionado consistió en embeber el húmero en cemento óseo, PMMA, (CMW, DePuy, Jonhson&Johnson) en una jeringa de 2mL incluyendo la fisis humeral proximal para evitar el riesgo de fracturas durante el ensayo a tracción. Este cemento de uso habitual en cirugía ortopédica garantiza una fijación estable que minimiza el riesgo de fracaso del ensayo. Debido a que el fraguado del cemento es una reacción exotérmica, el tendón adyacente se protegió con una solución de suero salino fisiológico a temperatura ambiente para minimizar el riesgo de necrosis térmica del mismo. Las muestras fueron congeladas a -20° hasta la realización del ensayo y posteriormente descongeladas a temperatura ambiente⁶⁶. Como ha sido descrito, con dicho proceso de congelación, conseguimos estandarizar las medidas biomecánicas y obviar posibles problemas de calibración del sistema.

3.1.2 Máquina de ensayos

El estudio biomecánico se realizó en el laboratorio de biomecánica de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED) con una prensa electromecánica fabricada por la firma SERVOSIS para la realización de ensayos mecánicos con muestras biológicas(Figura 25). El sensor de posición es un codificador óptico lineal y los captadores de fuerza son células de carga de la firma HBM de 20N y 200N, calibrados para detectar cargas pequeñas de hasta 1 N. Los datos son recogidos a través de un software de control universal PCD-2K diseñado para el sistema operativo Windows Vista y Windows 7, obteniéndose la curva tensión-deformación(Figura 26). La máquina de ensayo dispone de dos mordazas neumáticas con acoplamiento de caucho para la sujeción de las muestras biológicas.

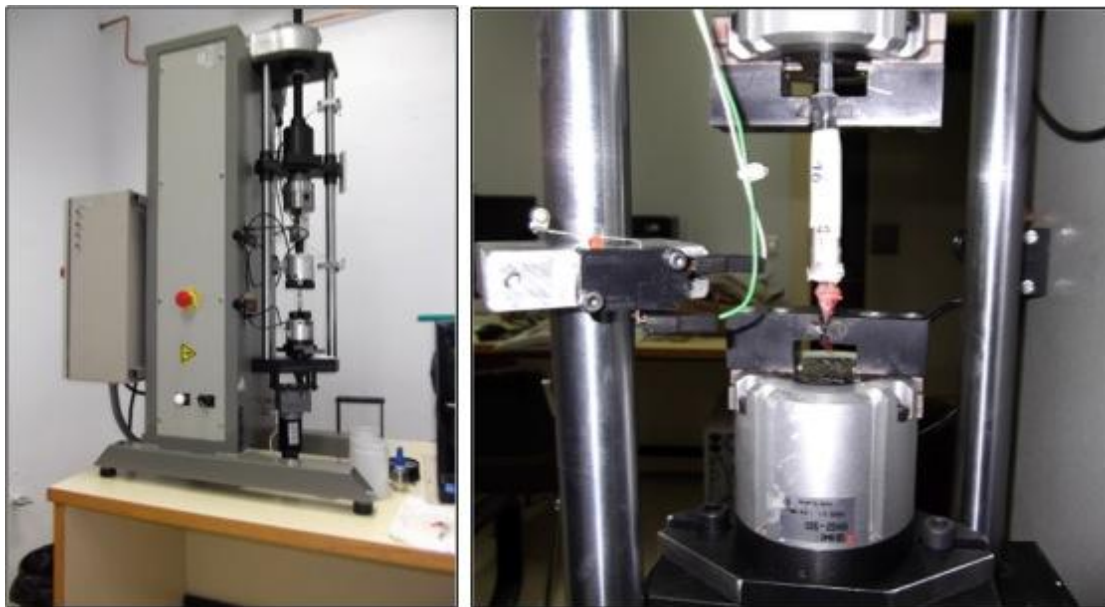


Figura 25. Imagen correspondiente a la máquina utilizada durante los ensayos biomecánicos. Consiste en una prensa electromecánica fabricada por la marca SERVOSIS. Posee un sensor de posición y captadores de fuerza (Laboratorio de Biomecánica de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de la Universidad a Distancia, UNED).

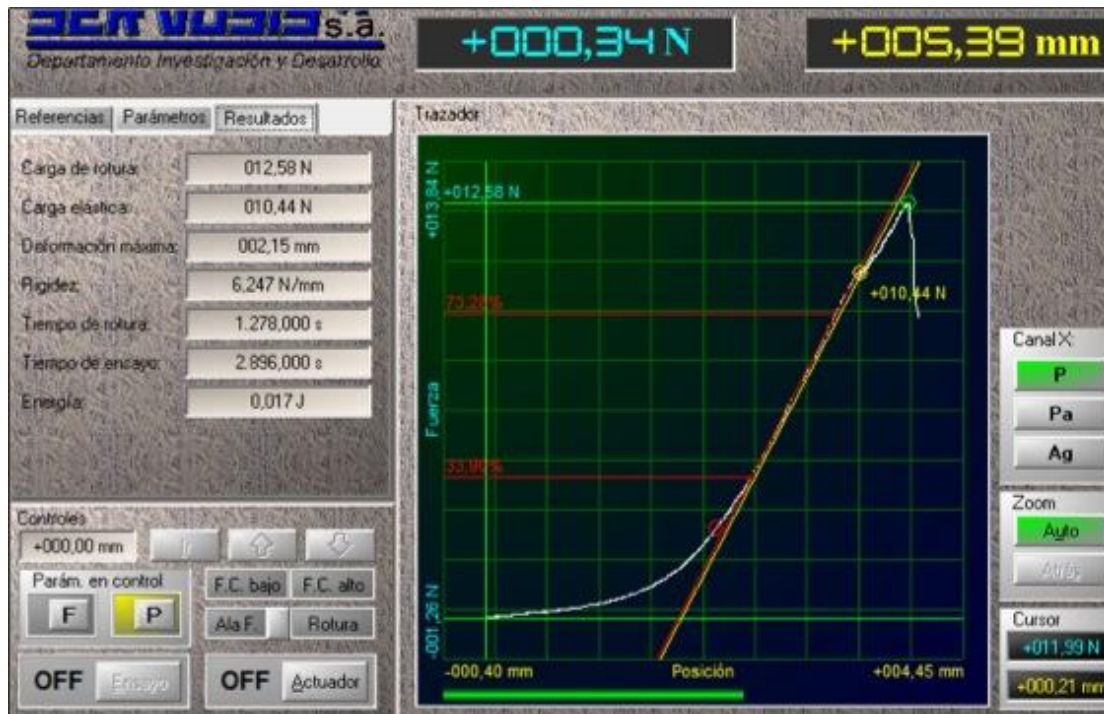


Figura 26. Imagen correspondiente a la curva obtenida como resultado del ensayo a tracción realizado durante el estudio biomecánico. Puede apreciarse la precarga de 0,1 N y los valores obtenidos en este caso.

3.1.3 Variables de medida de los parámetros biomecánicos

Se evaluaron los siguientes parámetros: La tensión de rotura, la deformación, la rigidez y la energía absorbida.

1. Tensión de rotura; Se define como la resistencia de la unión hueso-tendón ante solicitaciones de carga, en este caso a tracción, hasta la rotura. Este parámetro mide la resistencia del material independientemente de las características geométricas de la pieza. Se calcula en Newton.
2. Carga elástica; Se define como la alcanzada por un material cuando su deformación bajo carga desaparece inmediatamente al retirarla. Se calcula en Newton.
3. Deformación mecánica; Es el alargamiento experimentado en la entesis o zona de estudio durante el ensayo y se calcula en milímetros (mm).

4. Rigidez; Es la pendiente del diagrama tensión-deformación de la zona elástica del material. En ella, las tensiones aplicadas son proporcionales a los alargamientos producidos, siendo la pendiente el módulo de elasticidad longitudinal o módulo de Young. Se calcula en N/mm^2 .
5. Energía absorbida; Es el área bajo la curva tensión-deformación y nos indica la energía total absorbida por la entesis hasta la rotura. Se calcula en Julios (J).

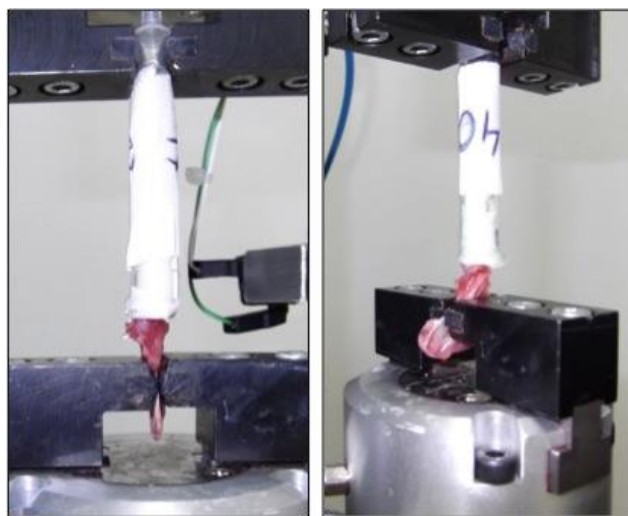


Figura 27. Imagen correspondiente a un ensayo a tracción durante el estudio biomecánico. Se puede apreciar la colocación de la pieza desde una visión anteroposterior y medio-lateral. La escápula se sitúa inferiormente y la jeringa con el húmero embebido en cemento en la localización superior

3.1.4 Realización de los ensayos

Las muestras extraídas se colocaron en la máquina de medición biomecánica, procediéndose a la obtención de datos. Para ello, la porción de la muestra correspondiente a la escápula se colocó en la mordaza inferior y la jeringa con el húmero embebido en la mordaza superior (Figura 27). La distancia desde la mordaza inferior hasta la inserción tendinosa fue en todos los casos de 5mm y la fuerza fue ejercida en la dirección del tendón. Se realizó una precarga de 0,1 N en todos los

ensayos para neutralizar la fase de acoplamiento de las curvas. La velocidad del estudio fue de 14 micras/segundo¹⁹⁵.

3.2 Estudio Histológico

La muestra de evaluación histológica está constituida por un total de 18 animales en los que se realizó cirugía bilateral y que fueron divididos en tres grupos de 6 animales (12 hombros) cada uno:

- a) Sutura únicamente.
- b) Sutura y aporte de esponja de colágeno.
- c) Sutura, aporte de esponja de colágeno e inyección de CMDL.

Cada una de estos grupos fue dividido en tres subgrupos en función del tiempo transcurrido entre la cirugía y el sacrificio: 24 horas, una semana y cuatro semanas.

3.2.1 Sacrificio y preparación de las muestras

Una vez sacrificados los animales mediante el mismo procedimiento descrito anteriormente para los especímenes destinados al análisis biomecánico, se procedió al examen inicial en fresco para describir las características macroscópicas del área lesional. Posteriormente se realizó una amputación supracondílea humeral distal y una disociación escápulo-torácica y se extrajo una pieza completa en la que se encontraban incluidas la articulación glenohumeral y la escápula, con toda la musculatura periescapular incluyendo el deltoides como músculo más superficial. Se procedió a su fijación mediante inmersión en una solución de formaldehído al 4% durante un mínimo de dos días. Posteriormente los especímenes se descalcificaron con una solución de EDTA 1:20 durante 15-21 días cambiando en medio cada 3 días, una vez comprobada la descalcificación de los tejidos se procedió a su deshidratación

con diferentes lavados en alcohol a concentraciones crecientes y xilol y por último fueron embebidos en parafina. Tras la inclusión en parafina se efectuaron cortes de 4 micras en el eje longitudinal y en el eje coronal para la realización de técnicas morfométricas y de inmunohistoquímica sobre cristales xilanizados (Fig. 28).



Figura 28. Imágenes correspondientes a la preparación de la muestra para el estudio histológico. Se puede apreciar sutura del músculo deltoide .

a) Técnicas Morfométricas

1. Hematoxilina-eosina según la técnica de Ehrlich.

Este método supone la aplicación de la tinción de hematoxilina, que por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; y el uso de eosina que tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida como el citoplasma.

2. Tricrómico de Masson para estudio del tejido conjuntivo y el colágeno de tipo I.

Permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I que forman fibras gruesas o haces y también evidencia en menor intensidad las fibras reticulares. Se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágeno.

3. Tinción de Verhoff-Van Gieson y Orceína para el estudio de las fibras elásticas.

4. Rojo Sirio para la distinción mediante el microscopio de luz polarizada entre el colágeno tipo I y colágeno tipo III.

b) Técnicas de inmunohistoquímica

Las secciones de los tejidos, rehidratadas en serie decreciente de alcoholes, fueron incubadas con peróxido de hidrógeno (0,3 % en Buffer fosfato salino –PBS- pH 7,4) durante 30 minutos para inactivar la peroxidasa endógena. Se utilizaron como anticuerpos primarios frente a colágeno tipo IV y CD31, ambos policlonales, a una dilución 1/100 (Biogenex. San Francisco CA. USA) para realizar la inmunohistoquímica, previa digestión enzimática con pepsina diluida al 0,1% en solución de HCL 0,1 M a 37° C durante 2 minutos. Se incubó durante 24 horas a 4°C. El anticuerpo secundario fue una inmunoglobulina biotinilada anticonejo, obtenida en cabra (Dako, Glostrup, Denmark), diluida 1/400. El tiempo de incubación fue de 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se trataron las preparaciones con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Dako). A continuación se realizó el revelado con diaminobencidina (Sigma, Barcelona, España) y después el contraste nuclear con verde de metilo o con hematoxilina de Harris. La deshidratación se hizo en alcoholes crecientes y xilol y el montaje con Depex. La especificidad de las reacciones inmunohistoquímicas se comprobó por incubación de las secciones con suero no inmune como sustituto del anticuerpo primario.

c) Técnicas de inmunofluorescencia

En cortes histológicos también se realizaron estudios de inmunofluorescencia para localizar las células teñidas con CellTracker CM-Dil en los tejidos tratados a lo largo del tiempo. Para la tinción de las células se siguieron las instrucciones del fabricante

(Invitrogen, Oregon, USA) con pequeñas modificaciones antes de inyectarse sobre los diferentes grupos de estudio; tras lavar las muestras con PBS, se les añadió 90µl de Dil liofilizado en 50 µl de DMSO (Dimetil sulfóxido) sobre 100ml de HBBS dejándolo incubar 5 minutos a 37°C y posteriormente 4 minutos a 4°C, a continuación se lavó la placa de cultivo con PBS y se añadió el medio de cultivo convencional dejándolo a 37°C y 5% CO₂. Las muestras fueron analizadas mediante fluorescencia en un microscopio invertido Leyca DMI 6000.

Estos análisis se realizaron en las muestras a las 24 horas y 1 semana. No se realizaron estudios a 1 mes debido a que la tinción con Dil es citoplasmática y se va perdiendo logarítmicamente con las divisiones celulares y con el tiempo, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El objetivo de esta tinción fue confirmar que las células inyectadas se mantenían en el lugar de su inyección al menos 1 semana, con lo que podría afirmarse que si existe efecto sobre la cirugía es asociado a la presencia de las CMDL.

3.2.2 Variables de medida

Para el estudio histológico se midieron las siguientes variables y se estratificaron los resultados en distintos grados:

1. Presencia de vasos:

Para evaluar la cantidad de vasos presentes en los diferentes tiempos y correlacionarlo con los 3 subgrupos realizados se estableció la densidad microvascular (DMV) en todas las muestras del estudio. Para ello se llevó a cabo el conteo del número de microvasos (vasos sanguíneos y linfáticos) presentes en cada una de las muestras incluidas en el estudio. Para detectar

dichos vasos, éstos fueron marcados mediante técnica inmunohistoquímica utilizando el marcador de células endoteliales CD31. Se estableció el siguiente gradiente mediante la observación con objetivo de 40x:

- 0: No microvasos.
- 1: Mínima: de 0-4 microvasos.
- 2: Moderada: de 5-12 microvasos.
- 3: Marcada: más de 13 microvasos.

2. Presencia de edema

- 0: ausencia de edema.
- 1: presencia de edema.

3. Presencia de linfocitos, monocitos e histiocitos:

Se realizó un conteo con objetivo de 40x de las células inflamatorias en 10 campos aleatorios obteniéndose una media en los casos estudiados.

- 0: no aparición de células.
- 1: de 1-3 células por campo de gran aumento.
- 2: de 4 a 15 células por campo de gran aumento.
- 3: mas de 15 células por campo de gran aumento.

4. Presencia de fibroblastos

Se realizo un conteo de fibroblastos en 10 campos aleatorios obteniéndose una media en los casos estudiados:

- 0: no aparición de fibroblastos.
- 1: de 0-1 fibroblastos.
- 2: de 2-3 fibroblastos.
- 3: mas de 3 fibroblastos.

5. Presencia de fibrocartílago

Se cuantificó la presencia de cartílago en la zona de unión hueso tendón.

0: ausencia de fibrocartílago.

1: presencia de fibrocartílago.

6. Presencia de colágeno tipo I, III.

Se cuantificó con la técnica de Rojo Sirio con el microscopio de luz polarizada. El colágeno de tipo I obtiene una refringencia amarillo anaranjada y el colágeno de tipo III una refringencia amarillo-verdosa.

0: ausencia de colágeno.

1: presencia de colágeno en menos del 25% del tejido.

2: presencia de colágeno en 25-75% del tejido.

3: presencia de colágeno en mas del 75% del tejido.

7. Presencia de colágeno IV

0: ausencia de inmunotinción.

1: presencia de inmunotinción.

8. Presencia de fibras elásticas

0: ausencia de fibras elásticas.

1: presencia de fibras elásticas.

4. Análisis estadístico

Los datos se procesaron informáticamente mediante una base de datos en formato *Microsoft Excel*. Esta base de datos fue más tarde importada para su tratamiento estadístico en el programa *Statistical Package for Social Sciences* versión 11.5 (SPSS, Chicago, IL).

Para la descripción de variables cuantitativas continuas se utilizó la media junto con la desviación estándar. Las variables cualitativas se describieron mediante frecuencias absolutas y frecuencias relativas expresadas en porcentaje. Cuando se consideró conveniente, el análisis descriptivo de las variables cualitativas se representó de forma gráfica como sectores o barras. Las comparaciones entre variables cuantitativas continuas se realizaron mediante test no paramétricos (U de Mann-Whitney). Para el estudio biomecánico se realizó en primer lugar un análisis comparativo entre el grupo control y el grupo experimental para cada tiempo de sacrificio. En segundo lugar se realizó un estudio comparativo intragrupo para ambos tiempos de sacrificio para analizar su comportamiento en función del tiempo. Para el estudio histológico, en las variables cualitativas se realizó una estratificación como ha sido descrito anteriormente, de tal forma que se pudieran considerar variables cuantitativas discontinuas. Posteriormente, estas categorías se reagruparon para mejorar la potencia estadística. Se utilizaron el test de Pearson (Chi cuadrado) y el test exacto de Fisher.

El nivel de significación se establece para valores de $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Complicaciones

Hubo un caso de muerte inmediata tras finalizar el periodo de anestesia y ese animal fue reemplazado. Todos los animales recuperaron actividad normal en la jaula. Se observó comportamiento normal a los 5 días en los que habían sido intervenidos unilateralmente y a los 7 días en los que habían sido intervenidos bilateralmente. Del total de las muestras, en un caso se detectó persistencia de hematoma en la región de sutura en el músculo deltoides y en otro caso infección superficial entre el tejido celular subcutáneo y el músculo deltoides. A pesar de la fijación en cemento de las muestras del grupo de estudio biomecánico, existieron 2 casos de epifisiolisis proximal humeral al comenzar el ensayo, que impidieron estudiar las propiedades de la unión osteotendinosa, por lo que fueron sustituidos por otros 2 animales. No se han encontrado datos en cuanto al número de epifisiolisis de otros grupos de investigadores, sin embargo, sí que se menciona la importancia de la fijación de la pieza para evitar este fenómeno¹⁹⁶. Del grupo correspondiente al análisis histológico, dos muestras se perdieron en el curso de la investigación.

2. Resultados del estudio biomecánico

2.1 Estudio comparativo entre grupo control y grupo experimental

A. Sacrificio a las dos semanas

El peso medio inicial del grupo control fue de 212,5 gr (DE 25,3) y del grupo experimental fue de 210,6 gr (DE 11,5). El peso medio final del grupo control fue de

256,3 gr (DE 37,3) y el del grupo experimental fue de 259,6 gr (DE 30,1). Ambos grupos resultaron comparables en peso inicial ($p=0,83$) y en peso final ($p=0,8$).

No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para ninguna de las variables estudiadas para este tiempo de sacrificio (Tabla 1). La *carga de rotura* fue de 14,05 N (DE 4,11) para el grupo control y 15,63 N (DE 4,77) para el grupo con aporte de CMDL ($p=0,23$). La carga elástica fue de 12,59 N (DE 4,01) en el grupo control y de 10,91 N (DE 3,33) en el grupo con aporte de CMDL ($p=0,36$). La *deformación mecánica* fue de 3,07 mm (DE 1,03) en el grupo control y en el grupo con aporte de CMDL fue de 3,79 mm (DE 1,55) siendo sus diferencias no significativas ($p=0,09$). La *rigidez*, medida en Newton/mm, fue de 5,53 (DE 1,59) para el grupo control y de 5,61 (DE 1,56) para el grupo con CMDL ($p=0,37$). Por último, la *energía absorbida* fue de 3,39 J (DE 2,33) para el grupo control mientras que para el grupo con CMDL fue de 7,42 J (DE 4,23), siendo sus diferencias no significativas ($p=0,06$) (Tabla 1).

	Carga de rotura (N)	Carga Elástica (N)	Deformación Mecánica (mm)	Rigidez (N/mm)	Energía Absorbida (J)
Grupo Control	14,05 (DE 4,11)	12,59 (DE 4,01)	3,07 (DE 1,03)	5,53 (DE 1,59)	3,39 (DE 2,33)
Grupo CMDL	15,63 (DE 4,77)	10,91 (DE 3,33)	3,79 (DE 1,55)	5,61 (DE 1,56)	7,42 (DE 4,23)
Valor p	0.23	0.36	0.09	0.37	0.06

Tabla 1. Resultados del estudio biomecánico: Sacrificio a las 2 semanas.
(CMDL: células troncales mesenquimales derivadas del tejido graso)

B. Sacrificio a las cuatro semanas

El peso medio inicial del grupo control fue de 202,5 gr (DE 12,5) y del grupo experimental fue de 200,75 gr (DE 7,2). El peso medio final del grupo control fue de 277,13 gr (DE 32,8) y el del grupo experimental fue de 276,69 gr (DE 25,3). Ambos grupos resultaron comparables en peso inicial ($p=0,88$) y en peso final ($p=0,8$).

No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para ninguna de las variables estudiadas para este tiempo de sacrificio (Tabla 2). La *carga de rotura* fue de 18,68 N (DE 3,49) para el grupo control y 18,76 N (DE 3,55) para el grupo con aporte de CMDL ($p=1$). La *carga elástica* fue de 13,76N (DE 3,47) en el grupo control y de 13,34N (DE 3,67) en el grupo con aporte de CMDL ($p=0,96$). La *deformación mecánica* fue de 3,89 mm (DE 1,74) en el grupo control y en el grupo con aporte de CMDL fue de 6,37 mm (DE 3,52) ($p=0,1$). La *rigidez*, medida en Newton/mm fue de 7,31 (DE 4,28) para el grupo control y de 6,7 (DE 2,73) para el grupo con CMDL ($p=1$) y la *energía absorbida* fue de 5,34J (DE 3,37) para el grupo control mientras que para el grupo con CMDL fue de 12,66J (DE 8,86) ($p=0,18$) (Tabla 2).

	Carga de rotura (N)	Carga Elástica (N)	Deformación Mecánica (mm)	Rigidez (N/mm)	Energía Absorbida (J)
Grupo Control	18,68 (DE 3,49)	13,76 (DE 3,47)	3,89 (DE 1,74)	7,31 (DE 4,28)	5,34 (DE 3,37)
Grupo CMDL	18,76 (DE 3,55)	13,34 (DE 3,67)	6,37 (DE 3,52)	6,7 (DE 2,73)	12,66 (DE 8,86)
Valor p	1	0.96	0.1	1	0.18

Tabla 2. Resultados del estudio biomecánico: Sacrificio a las 4 semanas.

(CMDL: células troncales mesenquimales derivadas del tejido graso)

A continuación se muestran en forma de diagrama los resultados de los valores anteriores comparando los resultados a las 2 y a las 4 semanas entre ambos grupos de estudio(Figura 29).

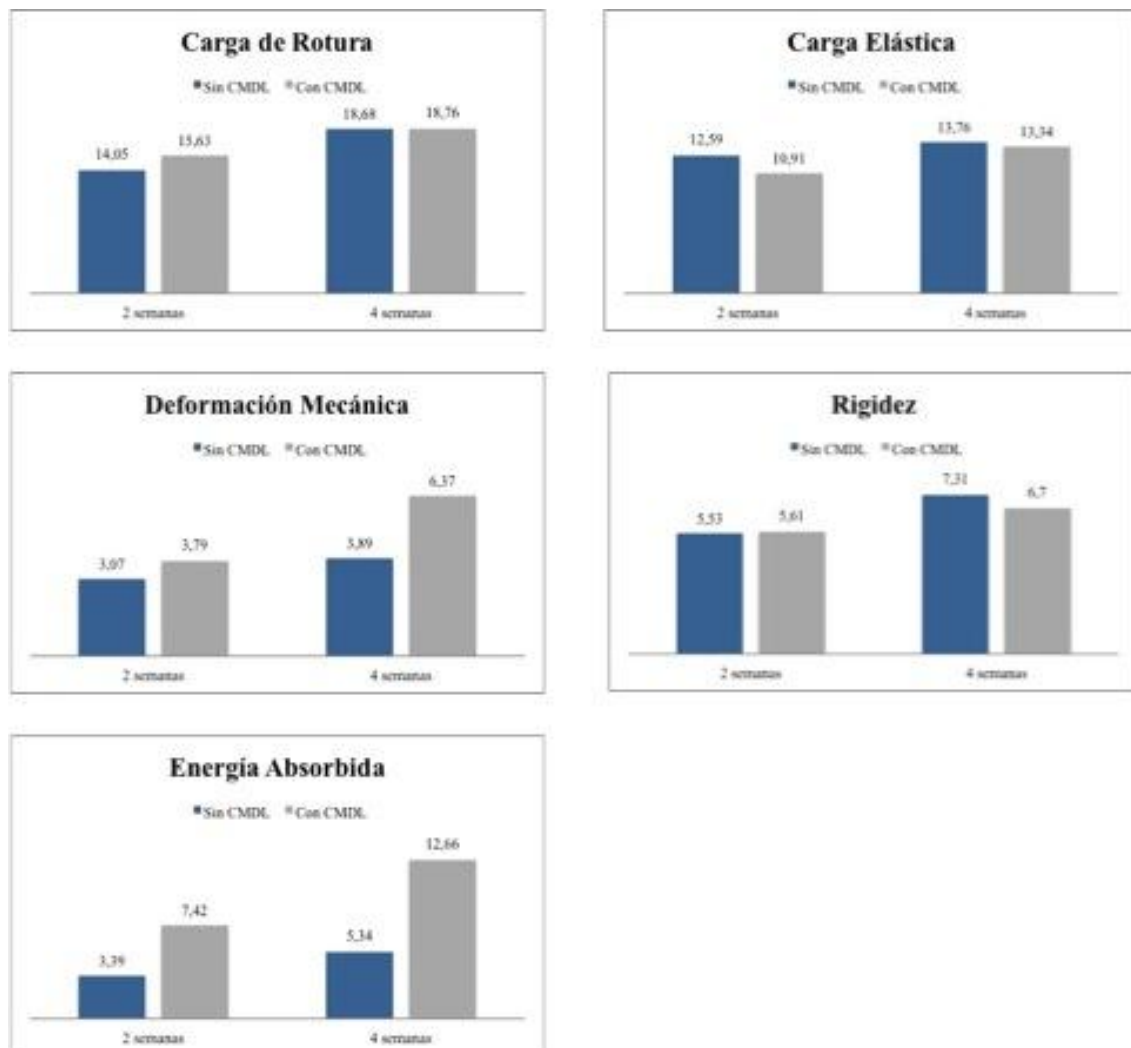


Figura 29. Diagramas de barras que muestran la comparación entre los diferentes parámetros biomecánicos para ambos tiempos de sacrificio entre los dos grupos de estudio. (Azul: Grupo control sin CMDL y gris: Grupo experimental tratado con CMDL).

2.2 Estudio comparativo intragrupo para los tiempos de sacrificio

Al comparar la *carga de rotura* para el grupo control entre los animales sacrificados a las dos semanas (14,05 N) y a las 4 semanas (18,67 N), los resultados demostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p= 0,04$) (Figura 30). Al comparar la carga de rotura para el grupo con aporte de CMDL entre los animales sacrificados a las dos semanas (15,63N) y a las 4 semanas (18,76 N) no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,17$). No se encontraron diferencias significativas para el resto de las variables (Tablas 3 y 4).

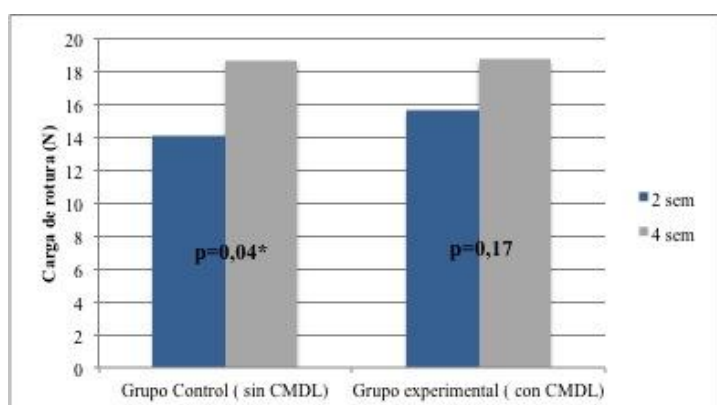


Figura 30. Diagramas de barras que muestran la comparación de la carga de rotura intragrupo a las 2 y 4 semanas de sacrificio. La diferencia entre ambos grupos fue significativa para el grupo control pero no para el grupo experimental.

	Carga de rotura (N)	Carga Elástica (N)	Deformación Mecánica (mm)	Rigidez (N/mm)	Energía Absorbida (J)
2 semanas	14,05 (DE 4,11)	12,59 (DE 4,01)	3,07 (DE 1,03)	5,53 (DE 1,59)	3,39 (DE 2,33)
4 semanas	18,68 (DE 3,49)	13,76 (DE 3,47)	3,89 (DE 3,52)	7,31 (DE 4,28)	5,24 (DE 3,37)
Valor p	0.04*	0.53	0.29	0.53	0.17

Tabla 3. Comparaciones intragrupo de las variables biomecánicas para el grupo control.

	Carga de rotura (N)	Carga Elástica (N)	Deformación Mecánica (mm)	Rigidez (N/mm)	Energía Absorbida (J)
2 semanas	15,63 (DE 4,77)	10,91 (DE 3,33)	3,79 (DE 1,55)	5,61 (DE 1,56)	7,42 (DE 4,23)
4 semanas	18,76 (DE 3,55)	13,34 (DE 3,67)	6,37 (DE 3,52)	6,7 (DE 2,73)	12,66 (DE 8,86)
Valor p	0.17	0.17	0.11	0.4	0.17

Tabla 4. Comparaciones intragrupo de las variables biomecánicas para el grupo con CMDL.

3. Resultados del estudio histológico

Para el análisis histológico se procedió primero a la evaluación anatomopatológica de las piezas según los criterios de estratificación descritos anteriormente. En segundo lugar se procedió a un análisis estadístico de los resultados obtenidos.

3.1 Observaciones groseras

En el estudio de las muestras se apreció una ausencia de continuidad en todas las muestras a las 24 horas. A la semana podía apreciarse una regeneración parcial de las diferentes fibras y a las 4 semanas no se observó discontinuidad en la zona de inserción de los tendones en ninguno de los casos (Figuras 31,32 y 33).

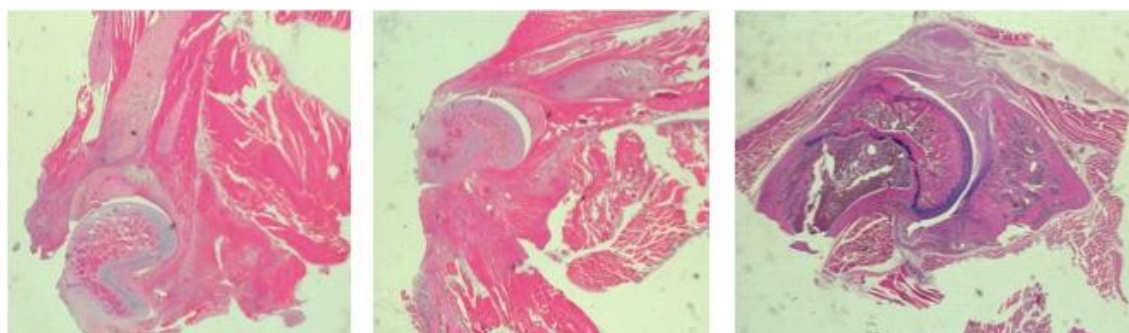


Figura 31. Imágenes correspondientes a una visión coronal de la región de inserción del manguito rotador. Puede apreciarse la cabeza humeral y la fisis humeral proximal. Así mismo se aprecia parte de la escápula y el tendón supraespinoso en las diferentes fases de cicatrización (Hematoxilina eosina 3x).

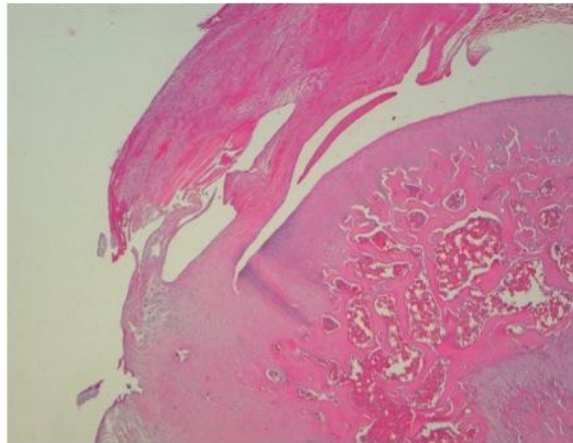


Figura 32. Detalle ampliado de la inserción del tendón supraespinoso en la tuberosidad mayor del húmero. Esta imagen corresponde a una semana de sacrificio. Puede apreciarse una cicatrización parcial del mismo (Hematoxilina eosina 10x).

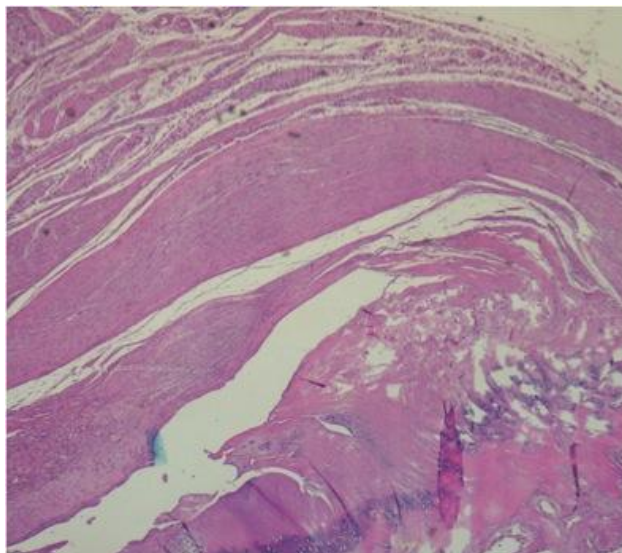


Figura 33. Detalle ampliado de la inserción del tendón supraespinoso en la tuberosidad mayor del húmero. Esta imagen corresponde a un mes de sacrificio. Puede apreciarse una cicatrización completa (Hematoxilina eosina 20x).

3.2 Inmunofluorescencia

Se realizaron estudios de inmunofluorescencia frente a Dil confirmando la presencia de CMDL en los tejidos a las 24 horas y a los 7 días. A las 24 horas se observan las células desordenadas en la zona de la inyección entre el tendón tratado y la esponja de colágeno. A la semana las células que se visualizan están ordenadas de forma lineal limitando ambas superficies (Figura 34).

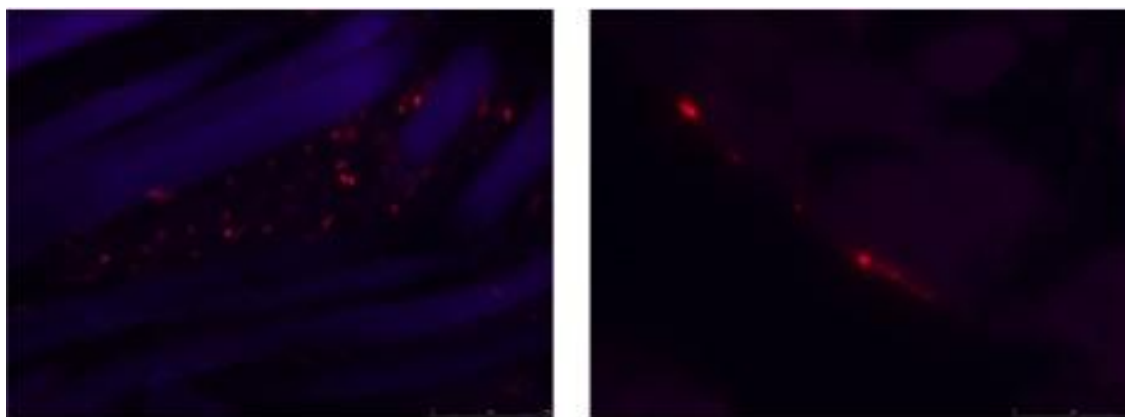


Figura 34. Imagen de inmunofluorescencia con microscopio invertido Leyca DMI 6000. Pueden apreciarse a 595nm, las células troncales mesenquimales derivadas de tejido graso que previamente habían sido teñidas con Dil. La muestra de la izquierda corresponde a un día y la de la derecha a 1 semana.

3.3 Análisis histológico intergrupar

A. Muestras obtenidas a las 24 horas de la cirugía

En las muestras correspondientes al grupo sin CMDL (sutura y aporte de esponja), se puede apreciar a las 24 horas una respuesta inflamatoria aguda típica temprana. Ésta se caracteriza principalmente por la presencia de edema importante con predominio de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) con una presencia de entre 4 y 15 por campo de gran aumento (CGA) (x40) o incluso mayor de 15 por campo y escaso número de macrófagos. Es llamativa así mismo la presencia de vasos de pequeño diámetro, existiendo en más de la mitad de los casos una presencia de entre 5 y 12 microvasos por campo de gran aumento (x40). En cuanto al grupo en el que se aplicaron CMDL (Sutura, esponja y CMDL), se detecta un proceso de inflamación aguda tardía con un edema de menor intensidad ($p=0,49$) y con una menor presencia de vasos ($p=0,43$). En este grupo la presencia de PMN en ningún caso fue mayor de 1 a 3 células por campo de gran aumento, lo que si constituye una diferencia significativa ($p=0,03$). Para este tiempo de sacrificio no se detectaron linfocitos,

histiocitos ni fibroblastos en ninguno de los grupos. Tampoco se detectó la presencia de colágeno de ninguno de los tipos (Figuras 35 y 36).

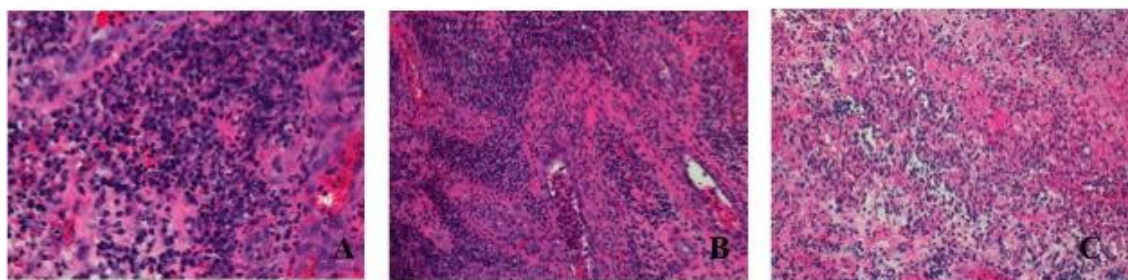


Figura 35. Imágenes correspondientes a muestras hematoxilina-eosina a las 24 horas. Diferentes estadios del patrón de inflamación aguda con edema, vasos y abundantes PMN. A) Únicamente sutura (20x); B) Sutura y aporte de esponja (40x) C) Sutura, aporte de esponja y CMDL (10x).

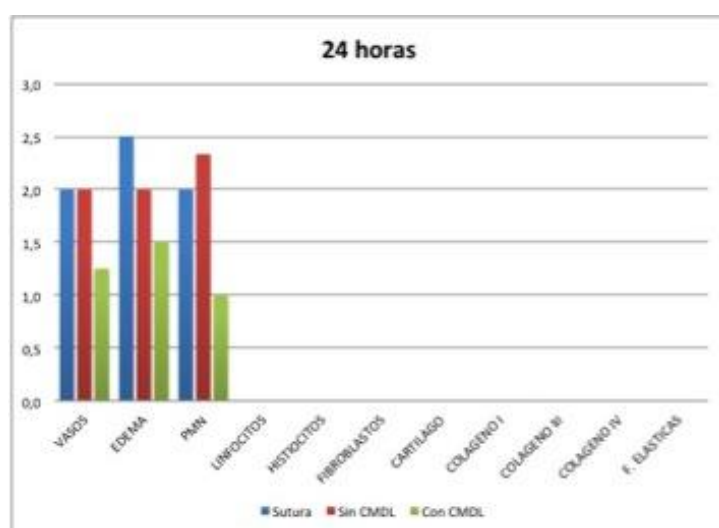


Figura 36. Diagrama de barras que muestra la presencia de las diferentes variables de histología a las 24 horas de sacrificio.

B. Muestras obtenidas a la semana de la cirugía

En el grupo control el patrón de inflamación aguda persiste, encontrando hallazgos similares a los descritos anteriormente (ausencia de linfocitos, macrófagos y predominio de PMN). Además se aprecia una presencia importante de vasos, mayor de 12 microvasos por CGA y aumento de edema. Existe proliferación capilar y formación de tejido fibrovascular.

En el grupo tratado con CMDL la presencia de vasos y edema es menor, siendo estas diferencias estadísticamente significativas para la presencia de vasos($p=0,03$) pero no para la de edema($p=0,14$). En la mayoría de los casos la presencia de vasos fue de 0-4 microvasos por CGA, no sobrepasando el límite de 5 en ninguna de las ocasiones. La diferencia en la presencia de linfocitos e histiocitos fue también significativa entre ambos grupos ($p=0,03$). La inflamación podría catalogarse como inflamación crónica temprana ya que hay un aumento de células plasmáticas y se empieza a observar la formación de granulomas con presencia de células gigantes (Figuras 37 y 38).

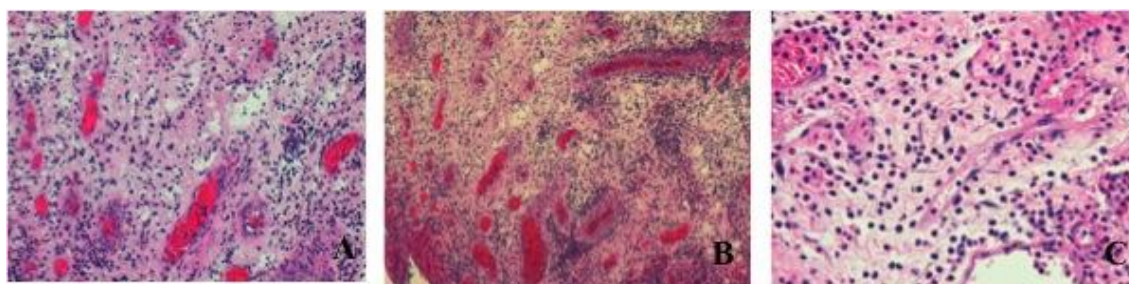


Figura 37. Imágenes correspondientes a muestras de hematoxilina-eosina a 1 semana. Patrón de inflamación aguda con edema, vasos y abundantes PMN. A) Únicamente sutura (20x); B) Sutura y aporte de esponja (10x); C) Sutura, aporte de esponja y CMDL(40x).

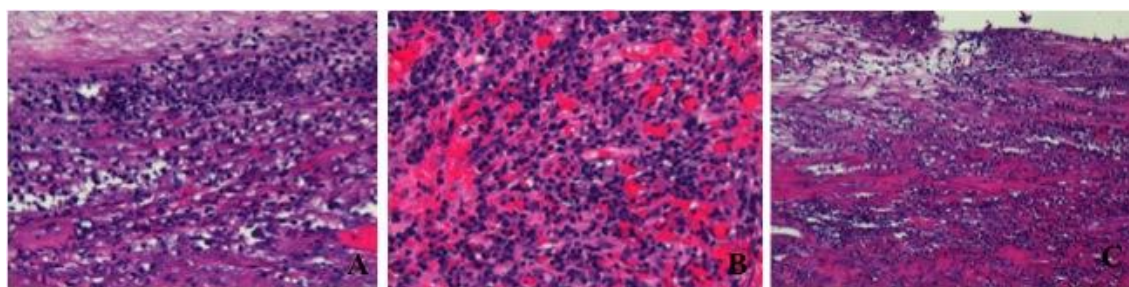


Figura 38. Imágenes correspondientes a muestras hemotoxilina eosina a 1 semana. Patrón de inflamación crónica con presencia de linfocitos y menor cantidad de vasos A) Únicamente sutura (20x); B) Sutura, aporte de esponja (20x) C) Sutura, aporte de esponja y CMDL (10x).

En cuanto a la formación de tejido de reparación, en el grupo control, la presencia de fibroblastos fue elevada, encontrándose todos los valores en el rango alto de estratificación, con más de 2-3 fibroblastos por CGA. En el grupo con aporte de CMDL por el contrario, en todas las muestras se detectó un número menor a 2 fibroblastos por campo ($p=0,03$). De igual manera, la presencia de cartílago se detectó de forma mayoritaria en el grupo control, estando ausente en todas las muestras del grupo con aporte de CMDL. Estas diferencias no alcanzaron valor estadísticamente significativo($p=0,14$). Para este tiempo de sacrificio no se detectaron diferencias en la cantidad de colágeno tipo I o III ni en su orientación, si bien, el colágeno tipo III era prácticamente indetectable para el grupo con CMDL(Figura 39). El colágeno tipo IV únicamente fue identificado en las paredes de los vasos.

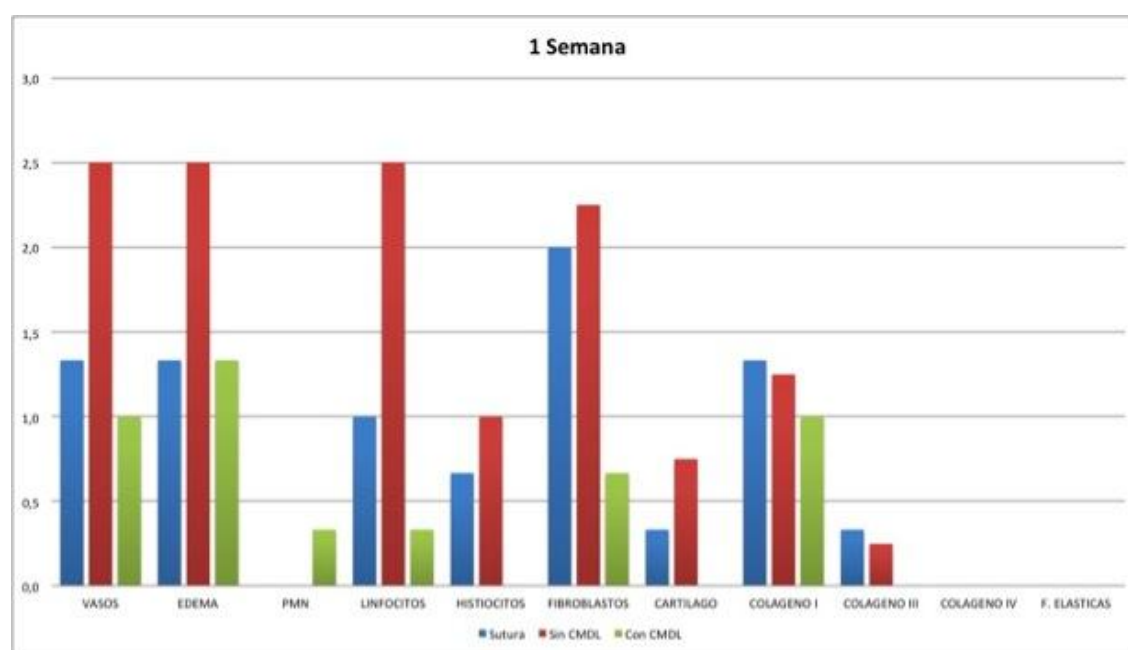


Figura 39. Diagrama de barras que muestra los resultados histológicos obtenidos en los especímenes sacrificados transcurrida una semana de la cirugía. Los valores de cada variable se encuentran estratificados según lo referido en material y métodos.

C. Muestras obtenidas a las 4 semanas de la cirugía

Esta fase se caracteriza por una inflamación de tipo crónico con abundantes linfocitos y granulomas muy desarrollados y por la presencia de fibras de colágeno con densidad y orientación variable. La presencia de PMN disminuye de forma llamativa en ambos grupos. Las diferencias entre ambos grupos eran menores.

En ambos grupos la presencia de edema y vasos había disminuido drásticamente comparada con las previas. Puntualmente, en algún espécimen del grupo sin aporte de CMDL podían apreciarse un número de vasos mayor de 4 microvasos por CGA o edema de grado 2-3 pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=1$). No se apreciaron diferencias en cuanto al número de linfocitos e histiocitos. Tampoco se apreciaron diferencias significativas en cuanto a la presencia de fibroblastos ($p=0,43$). Sin embargo, podía apreciarse una cantidad mayor de 2-3 fibroblastos por CGA en todos los especímenes del grupo control y este número era menor en el grupo con aporte de CMDL, en el que la mitad de los especímenes presentaban menos de 2 fibroblastos por CGA (Figura 40).

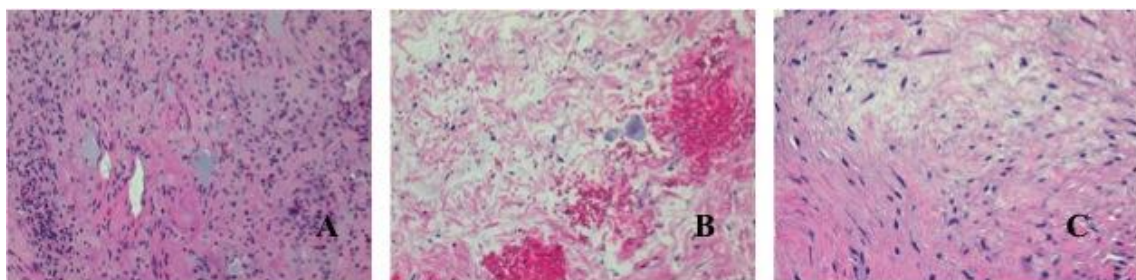


Figura 40. Imágenes de hematoxilina eosina correspondientes a 4 semanas. Patrón de inflamación crónica con presencia de linfocitos, menos edema y presencia de fibras de colágeno. A) Únicamente sutura (40x); B) Sutura, aporte de esponja (40x) C) Sutura, aporte de esponja y CMDL (63x).

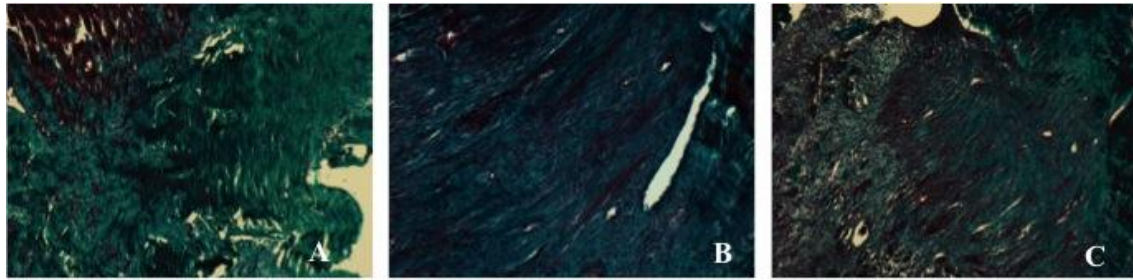


Figura 41. Imágenes correspondientes a muestras de tricrómico de Masson al mes de la cirugía en el que se observan las fibras de colágeno y su orientación en función de la fuerza tensil del tendón. A) Únicamente sutura (x10); B) Sutura, aporte de esponja (20x) C) Sutura, aporte de esponja y CMDL (20x).

En ambos grupos podían apreciarse fibras de colágeno en línea con la dirección de la fuerza tensil del tendón (Figura 41). El tejido era menos celular y más organizado, se apreciaba continuidad de las fibras de colágeno desde el hueso hasta el tejido de formación fibrovascular, pero no se apreciaba una inserción directa como la nativa. En ambos grupos la presencia de colágeno tipo I y tipo III era abundante, encontrándose en más del 25-75% del tejido en la mayoría de los casos. No existían diferencias significativas entre ambos grupos ($p=1$). Era llamativo, sin embargo, el mayor aumento de colágeno tipo III entre ambos tiempos de sacrificio en el grupo con CMDL. La cantidad de cartílago presente fue mayor en el grupo control que en el grupo que había recibido CMDL, de tal forma que en el primer grupo podía identificarse en todos los casos y tan sólo en uno de los casos del grupo experimental aunque estos valores no fueron significativos ($p=0,14$). No se detectó formación de hueso ectópico, presencia de colágeno tipo IV o fibras elásticas en ninguno de los grupos. A continuación, mostramos un diagrama de barras en el que puede apreciarse la evolución de los diferentes parámetros en función del tiempo (Figura 42).

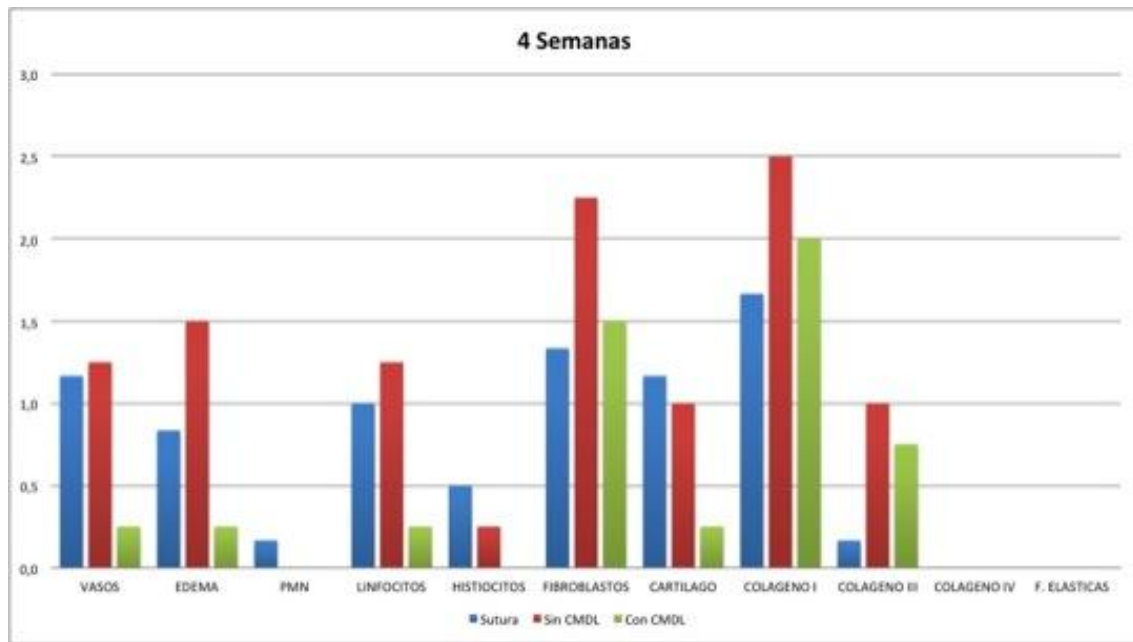


Figura 42. Diagrama de barras que muestra los resultados histológicos obtenidos en los especímenes sacrificados transcurridas 4 semanas de la cirugía. Los valores de cada variable se encuentran estratificados según lo referido en material y métodos.

3.4 Análisis histológico intragrupal

Para analizar la evolución de los diferentes parámetros medidos en función del tiempo dentro de cada uno de los grupos estudiados se ha recurrido a su representación en diagramas de barras (Figura 43). Se puede apreciar una diferencia en la evolución de los parámetros agudos (Vasos, Edema y PMN) como ya ha sido mencionada en el apartado anterior. Así mismo ocurre con los parámetros más abundantes en la fase final a la semana y 4 semanas del sacrificio. Puede apreciarse como la presencia de cartílago, colágeno tipo I y III es inexistente en el grupo con CMDL hasta el último tiempo de sacrificio.

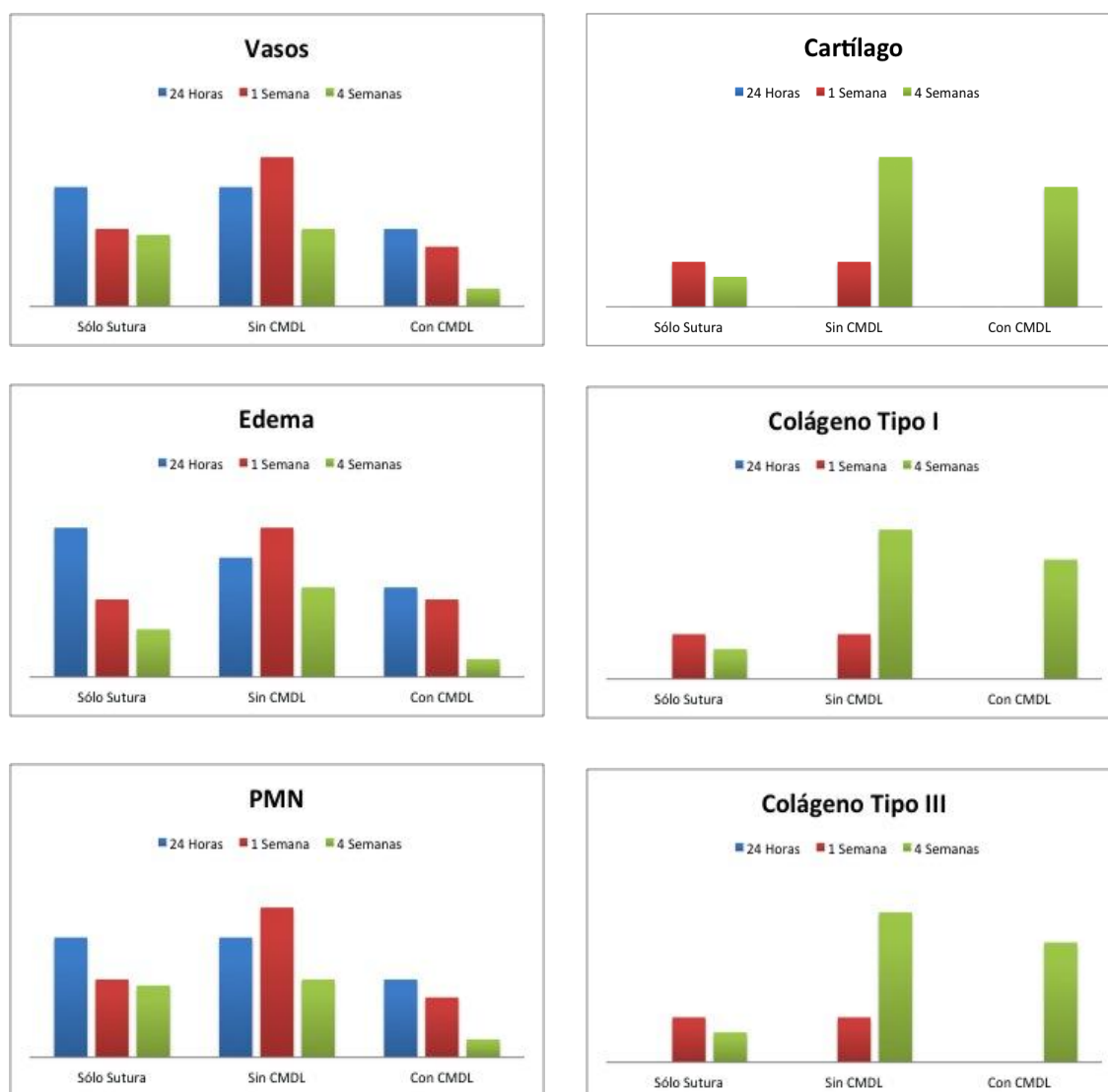


Figura 43. Diagramas de barras que muestran los resultados histológicos obtenidos analizado en función del grupo y del tiempo. Puede apreciarse la diferencia en el patrón de inflamación aguda así como la ausencia de colágeno tipo I y III en el grupo tratado con CMDL hasta las 4 semanas de sacrificio.

V. DISCUSIÓN

V. Discusión

1. Limitaciones del estudio

Una de las limitaciones del estudio podría ser el número de animales en cada grupo de tal manera que existiendo un número mayor podrían haberse encontrado diferencias significativas en algunos datos. En nuestro caso, para el estudio biomecánico, el número de animales por grupo fue de 8. Este número se ha considerado óptimo en otros estudios del manguito rotador con modelos experimentales muy similares que consideran que permite alcanzar un poder estadístico adecuado. Oh y cols., por ejemplo, en su estudio de manguito rotador en conejos con CMDL calcularon que el número óptimo sería de 7 animales por grupo para poder detectar diferencias significativas en la carga de rotura y basándose en este dato, utilizaron 8 por grupo¹⁶⁴. Sin embargo, otros autores han utilizado un número mayor de animales, como Gulotta y cols., en el que cada grupo de estudio biomecánico estaba formado por 15 animales, tanto en su estudio con aplicación de MSC¹⁹⁷ como en el de factores de crecimiento¹⁹⁵. Estos autores realizaron un estudio de potencia estadística en el que número óptimo sería 12 animales por grupo, considerando que la diferencia entre la carga de rotura de ambos grupos debiera ser de un 20% para ser relevante.

La segunda limitación sería que el hecho de que la desinserción del tendón haya sido unilateral en el caso del modelo biomecánico y bilateral en el modelo histológico y esto pudiera introducir un sesgo por la diferencia en la utilización de ambas extremidades por parte de la rata. Ambos diseños se han utilizado en diferentes modelos experimentales de manguito rotador sin encontrar diferencias en cuanto al modelo experimental. Así, Galatz y cols⁶⁶. en un estudio con fines principalmente histológicos realizó desinserciones

bilaterales y Kovacevic y cols¹⁰⁶. realizaron desinserciones unilaterales, considerándose ambos métodos opciones válidas.

En tercer lugar, se eligió sacrificar los animales a las 2 y 4 semanas para el estudio biomecánico y a las 24 horas, 1 semana y 4 semanas en el estudio histológico. Si se hubieran elegido puntos tardíos en el tiempo es posible que hubiéramos encontrado diferentes resultados. Sin embargo, numerosos autores han demostrado que el manguito rotador en este modelo animal en rata está prácticamente cicatrizado a las 4 y 8 semanas, con lo que sería más difícil apreciar las diferencias entre el grupo control y el experimental, como explicaremos de forma detenida más adelante¹⁹⁷.

En último lugar, la presencia de las CMDL se demostró mediante técnicas de inmunofluorescencia utilizando el marcador citoplasmático Dil. Hemos asumido que al estar presentes estaban activas y la presencia del tinción citoplasmática localizada demuestra que las células implantadas estaban vivas Sin embargo, no hemos demostrado su actividad de forma fehaciente como otros autores han descrito en sus modelos experimentales. Por ejemplo, Gulotta y cols¹⁹⁷. utilizaron MSC transducidas con un adenovirus que codificaba para una proteína (β galactosidasa) que al detectarse garantizaba la actividad de las mismas. Ruiz-Ibán y cols¹⁷⁴. utilizaron Bromodesoxiuridina, un nucleótido sintético análogo a la timidina que puede ser detectado en el ADN recién creado.

2. El animal de experimentación

De todos los animales de experimentación existentes se seleccionó la rata, en concreto la cepa Sprague- Dawley, por ser un animal ampliamente utilizado en la literatura para el estudio del manguito rotador¹⁹⁸. La estructura ósea, ligamentosa y muscular del hombro de la mayoría de los animales no se parece a la del ser humano.

Soslowsky¹⁹⁹ realizó un estudio en diferentes animales en los que se evaluaban 34 variables que se consideraban esenciales para establecer un modelo de estudio animal del manguito rotador. De ellos, el que se consideró más adecuado fue la rata debido a la presencia de los siguientes criterios:

1. Consta de musculatura en el hombro incluyendo manguito rotador, deltoides y bíceps.
2. Consta de elementos óseos incluyendo acromion, coracoides, clavícula y húmero.
3. Consta de articulación glenohumeral, acromioclavicular y espacio subacromial.
4. Posee capacidad para elevación y rotación de la articulación en varios planos.

En este caso se seleccionó el tendón supraespinoso, ampliamente utilizado en la literatura²⁰⁰. Si bien otros autores han realizado modelos experimentales con tendón del músculo infraespinoso¹⁰⁵ o subescapular¹⁶⁴. El tendón supraespinoso de la rata es prominente y se inserta en el troquíter. El criterio fundamental para que el modelo de manguito rotador sea correcto es la presencia de una relación entre el tendón supraespinoso y las estructuras inmediatamente superiores a él, similar al del ser humano. En el humano, el tendón supraespinoso pasa baja el arco formado por la coracoides, acromion y ligamento coracoacromial mientras que en la rata este arco se encuentra formado por la coracoides, clavícula y acromion, así como los ligamentos que comunican estas estructuras. Estudios de actividad de la rata han demostrado la presencia de movimientos por encima de la cabeza que pueden considerarse similares a los que ocurren en el hombro del ser humano. En estático, el más importante es de obtener el alimento que suele localizarse en la parte superior de la jaula²⁰¹. Con este desplazamiento de la pata delantera se produce un movimiento del tendón

supraespinoso por debajo del arco mencionado similar al observado en el ser humano. Además, estos mismos autores estudiaron las fases de la carrera de la rata, que son tres: impacto, apoyo equilibrado y despegue²⁰¹. Estas fueron analizadas mediante grabación en vídeo, radiografías y disección en cadáver. Se comprobó que en todas ellas, el tendón pasa repetidas veces por debajo del acromion, reproduciendo así un mecanismo similar al que ocurre en el hombro humano. Soslowsly y cols. diseñaron un estudio experimental en el que sometían a un grupo de ratas a un sobreesfuerzo físico y al comparar estos tendones con los del grupo control observaron que el tendón supraespinoso presentaba aumento de celularidad y una pérdida de la orientación normal de las fibras de colágeno, similar a la que se aprecia en la tendinopatía humana²⁰¹. Sin embargo, otros autores han utilizado otros modelos animales como el ratón⁷⁵, la oveja⁷⁷, el perro²⁰², el conejo²⁰³ o la cabra⁷⁹. Además se diseñó un protocolo de supervisión de los animales siguiendo las directrices propuestas por Morton D.B²⁰⁴ y durante todo el procedimiento se persiguieron los tres principios básicos en toda investigación con animales: Reducción(limitación del número de animales haciendo un cuidadoso diseño de los grupos), Refinamiento (se utilizaron técnicas mínimamente invasivas como la microcirugía y Reemplazamiento (ausencia de modelo inanimado que pueda aportar la información obtenida por el desarrollo de estas técnicas de lesión y reparación).

El modelo animal de rata tiene algunas desventajas. En primer lugar, debido a que la placa de crecimiento puede no cerrarse de forma completa hasta la edad adulta, a pesar de la madurez esquelética, el riesgo de fracaso del ensayo por epifisiolisis es mayor que en animales de mayor tamaño en las que éstas cierran al finalizar el crecimiento²⁰⁵. Otra desventaja en este modelo experimental es que debido a su pequeño tamaño es difícil utilizar implantes similares a los de la cirugía del manguito

rotador en humanos, al contrario que en la oveja, por ejemplo, ya que en ésta el tamaño del hombro es casi el mismo que el del ser humano¹⁹⁶. Sin embargo, en los últimos años ha aumentado la utilización de sistemas que simulan la sutura transósea o equivalente²⁰⁶, de tal manera que podría considerarse similar a estas técnicas que garantizan una mejor aposición del tejido en la unión hueso-tendón.

3. El modelo experimental

El modelo quirúrgico experimental fue diseñado de acuerdo con los modelos quirúrgicos que grupos internacionales habían realizado previamente para el modelo de manguito rotador²⁰⁷.

En este modelo experimental realizamos una desinserción del manguito rotador, en concreto del tendón supraespinoso y una sutura del mismo, lo que simularía una rotura aguda del manguito rotador que fuera reparada inmediatamente tras producirse. Aunque este es el modelo más ampliamente utilizado en la literatura¹⁰², no es la situación más frecuente que se plantea en la práctica clínica en humanos donde la patología del manguito rotador parece ser consecuencia de la influencia de una serie de factores extrínsecos e intrínsecos y suele ocurrir en un tendón previamente degenerado. Además, la rotura raramente afecta a un único tendón sino que suele afectar como mínimo al tendón supraespinoso e infraespinoso²⁷. Soslowsly y cols¹⁹⁹. en un intento de reproducir la degeneración previa del tendón en una única cirugía, desarrollaron un modelo en el que provocaban cambios en éste mediante la inyección de colagenasa antes de repararlo, y otro modelo experimental en el que provocaban una disminución del espacio subacromial mediante la alteración de la superficie inferior del acromion intentando recrear la situación anatómica que ha sido relacionada con la fisiopatología de la lesión del manguito rotador. Gimbel y cols.

(208) realizaron un modelo de desinserción del tendón supraespinoso en ratas en el que no se realizó sutura del mismo tras desinsertarlo y los animales fueron sacrificados a las 1,2,4,8 y 16 semanas post-quirúrgicas. Encontraron que existía un cambio inicial muy llamativo en la orientación de las fibras de colágeno seguido de una fase remodelación progresiva. Más recientemente, Buchmann y cols. realizaron una desinserción del tendón supraespinoso en ratas Sprague-Dawley en el que marcaron el cabo del tendón con un punto de sutura no reabsorbible para identificarlo en el momento del sacrificio²⁰⁹. Eligieron tiempos de sacrificio a las 3, 6 y 9 semanas y su objetivo consistía en analizar en qué momento los cambios degenerativos eran similares a los que podrían encontrarse en el tendón humano en el momento de la reparación del manguito. A las 9 semanas el 73% de las roturas habían cicatrizado de forma completa, mientras que a las 3 semanas podían detectarse defectos hasta en el 80% de los casos. Además, establecieron un coeficiente de degeneración tendinosa que resultó ser máximo a las 3 semanas. Estos hallazgos se asemejan a la situación que se plantea en el ser humano, por lo que podrían ser muy útiles en el diseño del modelo crónico. En él, serían necesarias dos cirugías, una para lesionar el tendón y otra para repararlo. Según Buchmann y cols., el momento ideal para la reintervención en función de la degeneración del tendón, sería por tanto a las 3 semanas de la rotura²⁰⁹. Recientemente, Killian y cols. han publicado el primer estudio en el que se realiza una sutura de una rotura crónica del manguito rotador en un modelo animal en ratas²¹⁰. En primer lugar provocan una rotura masiva con desinserción del tendón supraespinoso y del tendón infraespinoso en uno de los hombros de la rata. Tras un periodo de 8 o 16 semanas se realiza la segunda cirugía, reparando la rotura previamente provocada en uno de los hombros y provocando una rotura aguda en el hombro contralateral, con el fin de poder comparar la sutura de una rotura aguda con

una crónica. El sacrificio tiene lugar a las 4 y 8 semanas de esta segunda cirugía. Estos autores no demostraron claras diferencias entre ambos grupos, si bien era un modelo de rotura multi-tendón, en el que la formación de tejido cicatricial fue el que determinó el resultado final. Aún siguen siendo necesarios más estudios para elaborar con precisión un modelo crónico. Otros autores, como Rodeo y cols¹⁹⁶., con amplia experiencia en modelo experimental agudo, defienden que tras la desinserción del tendón, la retracción que se produce a pesar de la sutura puede considerarse similar al humano. En su modelo animal, de igual forma que en el nuestro, la rata no fue inmovilizada postoperatoriamente, con lo que la reparación rara vez permanece intacta y en su lugar se producen espacios que se rellenan de tejido cicatricial, lo que simularía la cicatrización en un tejido degenerado y hace del modelo agudo un modelo válido para el objetivo planteado.

Se utilizaron 2×10^6 CMDL para cada hombro intervenido de acuerdo con los protocolos de nuestro laboratorio de investigación. Las cantidades utilizadas en estudios con células mesenquimales troncales por otros grupos investigadores son variables y dependen del tipo de cirugía realizada y del animal de experimentación. Lim y cols¹⁸⁷. utilizaron entre 3 y 4×10^6 MSC para recubrir injertos de ligamento cruzado anterior en conejos. Sin embargo, Gulotta y cols¹⁹⁷. utilizaron 1×10^6 MSC en su modelo experimental de manguito rotador. La justificación para este volumen celular es que el área de superficie de la zona de unión hueso –tendón en el modelo de manguito rotador en rata podía considerarse un 25% con respecto a la de los túneles óseos femoral y tibial que se realizan en el modelo de ligamento cruzado anterior en conejos. Además, el peso medio de estos animales suele oscilar entre 2 y 3 kg mientras que el de las ratas suele oscilar entre 200 y 300 gr. En cuanto a las

CMDL, otros grupos investigadores como Pecanha y cols²¹¹. han utilizado este mismo número de células que se ha establecido como referente.

Como soporte para las células se utilizó una esponja de colágeno absorbente con el fin de prevenir la dispersión de las CMDL en el momento de la inyección. Se han descrito en la literatura numerosos materiales utilizados como vehículo de células troncales mesenquimales y factores de crecimiento, siendo los más utilizados geles de fibrina^{126,187} o esponjas de colágeno^{105,194}. En el caso de Rodeo y cols¹⁰⁵. utilizan una esponja de colágeno implantándola entre el hueso y el tendón y ellos mismos han sugerido que ésta podría interferir con la cicatrización hueso-tendón. En nuestro caso se localizó sobre la sutura, y no entre el hueso y el tendón, y no se aprecia diferente de tasa de cicatrización, aunque sí parece comportarse como un agente pro-inflamatorio en la fase inicial.

En nuestro modelo, tras la cirugía se permitió movilidad libre de las ratas en la jaula, como ha sido descrito por numerosos autores¹⁰⁵. En general, el protocolo de rehabilitación tras la cirugía de manguito rotador en humanos incluye de forma casi invariable un periodo de inmovilización con cabestrillo y ejercicios pasivos y activos después²¹². Keener y cols. han demostrado recientemente en su grupo de pacientes operados con técnica de doble hilera que no existen diferencias entre una rehabilitación pasiva precoz y una inmovilización temporal. El primer grupo comenzaba ejercicios activos a las 6 semanas y el segundo a los 3 meses⁴⁸. La incapacidad para controlar la movilidad postoperatoria se considera una de las principales limitaciones de los modelos animales de manguito rotador y que dificultan la extrapolación de los resultados a la investigación clínica. Existen ejemplos de inmovilización de manguito rotador en ratas como el de Peltz y cols.²¹³ en el que desarrollaron un cabestrillo modificado inmovilizando la extremidad intervenida junto

con el torso de la rata, sin embargo, su uso no se ha generalizado. Estos mismos autores realizaron también un estudio en el que comparaban dos grupos de ratas tras dos semanas de inmovilización con cabestrillo. Un primer grupo en el que, tras estas dos primeras semanas, se permitía actividad libre y un segundo grupo en el que se hacía un programa de ejercicios pasivos, que resultó ser deletéreo para las propiedades biomecánicas del tendón y que relacionaron con el exceso de cicatrización⁸⁶. Gimbel y cols.²¹⁴ publicaron en 2007 un trabajo en el que defendían que la inmovilización temporal proporcionaba mejores características histológicas a la reparación con mejor orientación de las fibras de colágeno y con ello, mejores resultados biomecánicos. Ambos pertenecen al grupo de Soslowly, que han publicado estudios posteriores en modelos de manguito rotador en ratas y no especifican en su metodología si continúan inmovilizando a las ratas²¹⁵. En nuestra opinión, la libre movilidad de los animales en la jaula es un método que permite que el animal comience su actividad cuando el dolor y la fase más aguda de la inflamación cesa, y con ello evitar el sobreesfuerzo que puede suponer la movilidad pasiva o incluso la inmovilización por la propia defensa del animal ante una situación desconocida para él.

En cuanto a los tiempos de sacrificio, nosotros elegimos analizar los animales a las 2 y 4 semanas para el estudio biomecánico y a las 24 horas, 1 semana y 4 semanas para el estudio anatomo-patológico. Sin embargo, es posible que se hubieran obtenido resultados diferentes si el sacrificio hubiera tenido lugar precozmente o más tarde en el tiempo. Se eligieron estos puntos en el tiempo porque la hipótesis inicial era detectar cambios en el proceso de cicatrización que mejoraran las propiedades biomecánicas del tejido de reparación. En primer lugar, se ha demostrado que la cicatrización de los tendones en ratas²¹⁶, cuando se suturan de forma aguda e incluso

cuando se dejan sin suturar²⁰⁹, se ha producido de forma completa a las 8 y 9 semanas respectivamente. Desde nuestro punto de vista sería difícil encontrar diferencias biomecánicas entre el grupo experimental y el grupo control con el tendón completamente cicatrizado. En segundo lugar, en nuestro estudio histológico, utilizamos tiempos más precoces para poder determinar con exactitud la influencia de las CMDL tanto en la inflamación aguda como en la crónica. El efecto de las CMDL es precoz en el tiempo y por ello, la tendencia en los estudios histológicos es a utilizar cada vez tiempos de sacrificios más precoces para poder detectar pequeños cambios en los procesos inflamatorios. Así, Bedi y cols.¹⁰² por ejemplo, realizaron el sacrificio en su modelo experimental a los 5 días, 8 días, 2 semanas y 4 semanas.

4. La utilización de CMDL: Bioseguridad

Respecto a la utilización de CMDL, las células troncales más utilizadas hasta el momento en la práctica clínica han sido las procedentes de médula ósea. Sin embargo, el proceso de obtención es, en nuestra opinión, más doloroso para el paciente y el número inicial de células que se obtiene es menor^{147,217}. El tejido graso es ubicuo y fácil de obtener en grandes cantidades mediante lipoaspirado, bajo anestesia local y con poco dolor para el paciente¹⁹¹. Además, un gramo de tejido adiposo proporciona 5×10^3 células troncales mesenquimales, 500 veces más que el número de células madre mesenquimales que se pueden obtener de un gramo de médula ósea²¹⁸. Por lo tanto, el tejido graso puede ser considerado una fuente rica en células troncales con menor morbilidad para el paciente en el caso de que se aplique en humanos²¹⁹. El proceso de preparación de CMDL es también más fácil que el de MSC, lo que constituye una ventaja adicional.

En el grupo de Terapia Celular del Hospital La Paz de Madrid existe una prolífica línea de investigación y desarrollo de células troncales mesenquimales derivadas de tejido lipídico^{185, 191, 220, 221, 222}. Como se ha mencionado anteriormente, se ha elegido esta estirpe celular por su fácil obtención mediante métodos no invasivos, su gran rendimiento y por la seguridad y estabilidad que han demostrado en estudios realizados por nuestro grupo y estudios a nivel internacional.

La utilización de CMDL es generalizada, no sólo en Cirugía Ortopédica. Numerosos ensayos clínicos a nivel internacional y nacional han demostrado su bioseguridad^{149,174,176,177,180,185}. Así mismo, en los estudios realizados en nuestro laboratorio no se han descrito complicaciones relacionadas con el uso de células troncales mesenquimales derivadas de la grasa, lo que proporciona ciertas garantías de su bioseguridad. Sin embargo, Rubio y cols.²²³ publicaron por primera vez la transformación neoplásica y la capacidad de desarrollar tumores de las CMDL en un modelo experimental de ratón. Esta transformación neoplásica in vitro se produjo en cultivos en los que se permitió el crecimiento más allá de la subconfluencia, manteniéndolos más de dos meses después del aislamiento celular. En estas células se demostró la transformación neoplásica mediante el estudio del cariotipo, que confirmó la existencia de cambios en el DNA. Se observó además que eran células de crecimiento anómalo o no controlado, capaces de desarrollar tumores al inocularse en ratones inmunodeprimidos. Por el contrario, cuando se cultivaron CMDL evitando el crecimiento más allá del 85% de confluencia celular no se encontraron alteraciones del DNA ni capacidad de inducir la formación de tumores en animales inmunodeprimidos. Ninguno de los grupos internacionales que trabajan con CMDL han comunicado complicaciones de este tipo ni han sido capaces de reproducir los resultados de Rubio y cols. En 2010, García y cols.²²⁴, 5 de los 7 autores del artículo

original, han comunicado la incapacidad de reproducir esos resultados y demostraron que el hallazgo se debió a un fenómeno de contaminación cruzada con una línea celular tumoral HT1080 y el artículo ha sido, por tanto, rechazado. Estos datos avalan la posibilidad de aplicación de este tipo de terapia en seres humanos y por tanto la aplicabilidad de nuestro modelo experimental. En nuestro estudio tampoco hemos encontrado ningún dato que induzca a pensar en la transformación neoplásica si bien los tiempos de seguimiento son cortos.

5. Nuestra hipótesis: Interpretación de los resultados

El objetivo de nuestro estudio es analizar el efecto de la aplicación de células troncales mesenquimales derivadas de tejido graso (CMDL) en las propiedades biomecánicas e histológicas de un modelo animal de rotura del manguito rotador. Como se ha comentado previamente, las roturas del manguito rotador constituyen una lesión muy prevalente en la sociedad actual con un incremento en su incidencia del 238% en los últimos 10 años y que supone un gran coste económico para la sociedad^{225,226}. Se ha demostrado, así mismo, que la tasa de re-rotura de las reparaciones del manguito rotador es muy alta y con ella, la cirugía de revisión del manguito rotador sigue creciendo de forma progresiva²²⁷⁻²³⁰. Por lo tanto, una de las grandes controversias en la cirugía del manguito rotador en el momento actual es si realmente el hecho de que exista ausencia de cicatrización condiciona el resultado clínico. Mientras que algunos autores defienden que la función y la satisfacción del paciente no depende de la integridad de la reparación, otros autores, defienden lo contrario, es decir, que la cicatrización de la lesión condiciona la presencia de un buen resultado²³¹⁻²³³. Este concepto es la base de nuestra investigación. Hoy sabemos, gracias a la cirugía de revisión y a la evolución de las técnicas de imagen, que la re-

rotura en muchas ocasiones no se debería considerar re-rotura sino ausencia de cicatrización. Iannotti y cols. han demostrado mediante resonancia magnética que la mayor parte de lo que denominamos re-roturas ocurren de entre las 6 y 26 semanas tras la cirugía²³⁴. En nuestra experiencia, son la minoría de los pacientes los que relatan un episodio traumático, lo que unido a los hallazgos anteriores, nos hace pensar que la ausencia de cicatrización es la causa más probable de este fracaso clínico. Otro hecho importante que apoya esta teoría es que la mayoría de los fracasos ocurren en la zona hueso-tendón o en la zona tendinosa propiamente dicha a través de las suturas⁵⁶.

En nuestro trabajo, intentamos, mediante la aplicación de las CMDL, demostrar si podrían conseguirse mejores resultados biomecánicos, representados principalmente por la carga de rotura, basándonos en unas mejores características histológicas de la zona de cicatrización. Sin embargo, desde el punto de vista biomecánico no hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a la carga de rotura al comparar el grupo de animales en el que se han aplicado CMDL y el grupo en el que no, para ninguno de los tiempos de sacrificio. Gulotta y cols. realizaron un estudio en el que comparaban también dos grupos de animales, uno en el que realizaron sutura del manguito y aporte de MSC y otro en el que realizaron sólo sutura sin aporte de MSC. Al igual que en nuestro caso, todos las muestras del estudio biomecánico fracasaron en la unión hueso-tendón. En su estudio, los sacrificios se realizaron también a las 2 y 4 semanas y sus valores medios de carga de rotura fueron, a las 2 semanas 11,6N (DE 3,5) para el grupo control y 11,2N (DE 2,3) para el grupo con MSC y a las 4 semanas, 20,4N (DE 3,4) para el grupo control y 20,8N (DE 4,4) para el grupo con MSC, sin ser estas diferencias significativas. Tampoco encontraron diferencias significativas en ninguno de los demás parámetros biomecánicos. Oh y cols.¹⁶⁴

realizaron un estudio con un modelo animal en el que utilizaron CMDL. Provocaron roturas crónicas en tendón subescapular en conejos, por lo que el modelo es menos comparable con el que nosotros planteamos, pero tampoco fueron capaces de demostrar diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a las propiedades biomecánicas. En nuestro caso, aunque no encontramos diferencias significativas en los demás parámetros del estudio biomecánico, son interesantes los datos correspondientes a la energía absorbida y la deformación mecánica a las 2 y a las 4 semanas. A las dos semanas, la energía absorbida fue 3,39 J (DE 2,33) para el grupo en el que no se aplicaron CMDL y 7,42 J (DE 4,23) en el grupo con CMDL ($p=0,06$). A las 4 semanas, estos valores fueron 5,34 J (DE 3,37) y 12,66 J (DE 8,86) respectivamente, lo que supone más del doble de la energía absorbida ($p=0,18$). Desde un punto de vista físico, este dato es perfectamente fácil de razonar cuando se analiza de forma conjunta con los datos de la deformación mecánica obtenidos. Así, en el grupo sin CMDL su valor a las 2 semanas fue 3,07 mm (DE 1,03) y para el grupo con CMDL fue 3,79 mm (DE 1,55); a las 4 semanas, para el grupo sin CMDL fue 3,89 mm (DE 1,74) y para el grupo con CMDL 6,37 mm (DE 3,52). Es decir, antes de llegar al fracaso mecánico, los tendones correspondientes a las muestras en las que se habían aplicado CMDL se deformaban más y absorbían una energía de casi el doble. Estos hallazgos podrían significar que el tejido neoformado en la región de la unión hueso tendón es más elástico y en definitiva, menos cicatricial.

Cuando hemos realizado comparaciones intragrupo entre los valores de carga de rotura a las 2 y a las 4 semanas, mientras que estas fueron significativas para el grupo no tratado ($p=0,04$) no ocurrió así con el grupo con CMDL ($p=0,17$). Gulotta y cols.⁸⁸, en su estudio, encontraron en todos los especímenes de ambos grupos que la carga de rotura fue mayor a las 4 que a las 2 semanas. Desde nuestro punto de vista, las CMDL

podrían ser capaces de modificar el patrón de inflamación aguda y subaguda y condicionar con ello un enlentecimiento en el proceso de cicatrización. A pesar de no encontrar diferencias significativas en cuanto a la carga de rotura a las 2 semanas entre ambos grupos, sus valores fueron mayores en el grupo en el que se habían aplicado CMDL (15,63N vs 14,05N). Estos datos son concordantes con los hallazgos histopatológicos de nuestro estudio, en el que en el grupo de CMDL tanto a las 24 horas como a la semana podían observarse un menor número de células inflamatorias y menos edema, con una transición más rápida hacía un infiltrado subagudo. A las 24 horas, en el grupo sin CMDL, se apreciaba lo que hemos denominado un patrón de inflamación aguda temprana mientras que en el grupo en el que se aplicaron CMDL correspondía a un patrón de inflamación aguda tardía. La presencia de PMN fue significativamente menor, lo que podría condicionar el tipo de cicatrización, haciendo que el tejido sea más elástico y con menor fibrosis. Sin embargo, en el segundo tiempo de sacrificio, es especialmente llamativa la menor presencia de fibroblastos y cartílago en el grupo tratado con CMDL. De hecho, la presencia de colágeno tipo I y III en el grupo con aporte de CMDL no es evidente hasta las muestras correspondientes a un mes de sacrificio, y sin embargo, no existen diferencias entre ambos grupos para este parámetro. En el grupo de CMDL el colágeno tipo I y III aparece desde el tiempo de sacrificio de una semana a las 4 semanas, mientras que en el grupo en el que no se aplicaron CMDL la aparición es precoz y más escalonada. Estos hallazgos podrían indicar que al disminuir el proceso agudo inflamatorio en un primer momento, la cicatrización sufre un enlentecimiento. Este hecho no afectaría a la carga de rotura de una forma deletérea, sino lo contrario, ya que contribuye a mejores propiedades elásticas del tejido. Rodeo y cols. realizaron un estudio experimental en ovejas en el que se aportaba extracto de cortical ósea que contenía de

BMP-2 a BMP-7, de TGF- β 1 a TGF- β 3 y FGF junto con una esponja de colágeno tipo I¹⁰⁵. Obtuvieron un aumento en el volumen de hueso y de tejidos blandos y una mayor carga de rotura en los ensayos biomecánicos. Sin embargo, cuando estos valores se normalizaron por volumen de tejido, no se observaron diferencias entre ambos grupos, lo que podría sugerir que aunque estos factores habían acelerado el proceso de cicatrización, no modificaban las características del tejido de reparación. En nuestro caso, sería el fenómeno contrario, en el que si parecen apreciarse diferencias en el tipo de cicatrización, pero no existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de la carga de rotura. Ide y cols.²³⁵, diseñaron un estudio en el que se realizaba aporte de FGF y encontraron que el grupo de ratas en el que se había asociado FGF a la reparación del manguito rotador presentaba mayor índice de maduración de la entesis a las 2 semanas pero igual a las 4 y 6 semanas. Un fenómeno similar ocurría con el estudio biomecánico, mostrando superioridad en las 2 semanas pero igual carga de rotura a las 4 y 6 semanas. Estos hallazgos serían similares a los encontrados en nuestro trabajo, sin que en este caso las diferencias hayan sido estadísticamente significativas. Si consideramos el último tiempo de sacrificio, las 4 semanas, no existieron diferencias significativas para ninguno de los parámetros estudiados salvo para la presencia de cartílago. No apreciamos diferencias en la cantidad de colágeno ni en su organización ni en el patrón inflamatorio.

Existen varias teorías que han intentado dar explicación a la ausencia de regeneración de la entesis nativa en el manguito rotador. Algunas de ellas se basan en la presencia del fenómeno inflamatorio en la vida postnatal y otras en que la escasa vascularización que existe en esta región anatómica, lo que condiciona una insuficiente migración de las células que están implicadas en el proceso de cicatrización. Las CMDL pueden influir en ambos fenómenos. Este tipo de células,

como hemos mencionado anteriormente, han demostrado numerosos efectos beneficiosos en la cicatrización¹⁴⁹. En primer lugar, son capaces de modificarse en tenocitos en el lugar de implantación; En segundo lugar, son capaces de secretar durante largos periodos de tiempo citoquinas y factores de crecimiento que actúan de forma paracrina estimulando la cicatrización; y en tercer lugar, las CMDL son capaces de estimular el nicho de células troncales presentes en el lugar de implantación promoviendo su diferenciación a la estirpe celular precisa. Han demostrado favorecer la cicatrización en casos complejos como son las fístulas perianales en la Enfermedad de Crohn y las fístulas traquoesofágicas con éxito^{191,220,236} y poseer un efecto antiinflamatorio¹⁸⁰. En nuestro estudio, sin embargo, no hemos encontrado diferencias en la carga de rotura ni en la cantidad u organización de colágeno tipo I y III. Otros tipos de células troncales que han demostrado efecto positivo en la cicatrización en tendón de Aquiles²³⁷ o en modelos de ligamento cruzado en conejos, no han resultado exitosas en el modelo de manguito rotador. Gulotta y cols.¹⁹⁷, en un trabajo metodológicamente similar al nuestro pero utilizando MSCs, tampoco encontraron diferencias en la cantidad de fibrocartílago o en la cantidad u orientación de las fibras de colágeno ni en ninguna de las variables biomecánicas medidas. Parece, por tanto, que es difícil reproducir el complejo ambiente que se produce en la zona de cicatrización hueso-tendón en el manguito rotador. Galatz y cols. demostraron en un modelo animal de reparación de tendón supraespinoso que en la vida postnatal no existe presencia de TGF- β_3 sino de TGF- β_1 y éste condiciona el proceso de reparación conduciendo a una cicatrización y no a la regeneración que se produce en la vida fetal⁶⁶. Kovacevic y cols utilizaron una matriz de fosfato tricálcico que liberaba TGF- β_3 en la región de la reparación del manguito rotador en ratas con el fin de comprobar si el aporte de este factor podría

incrementar las propiedades biomecánicas e histológicas de la entesis. Utilizaron microtomografía computerizada para evaluar la formación de hueso en la región e inmunohistoquímica e histomorfometría para valorar la cantidad y el tipo de colágeno que se formaba. Encontraron que en el grupo experimental existía mayor formación de hueso y fibrocartílagos, mejor organización del colágeno, mejor ratio en la proporción de colágeno tipo I con respecto al colágeno tipo III y mayor fuerza en el test biomecánico¹⁰⁶. Estos hallazgos son esperanzadores y corroboran la teoría de que el escenario ideal sería poder recrear el ambiente celular e inmunológico en el que la entesis se desarrolla en el proceso fetal. En nuestro estudio no encontramos diferencias en cuanto a la presencia de colágeno I o III ni tampoco en la carga de rotura entre ambos grupos.

En cuanto a la ausencia de vascularización, son numerosos los autores que han investigado este fenómeno en el modelo de manguito rotador. Existen dos conceptos que deben ser considerados entidades diferentes. Por una parte, la posible hipovascularización de una región del tendón supraespinoso que se ha relacionado con la mayor incidencia de roturas y menor tasa de cicatrización^{14,238}. Por otra parte, una vez producida la lesión, se ha demostrado que existe un desequilibrio entre citoquinas proinflamatorias, antiinflamatorias y se ha definido lo que algunos autores denominan perfil angiogénico: IL-1, IL6, IL8, IL10, VEGF, bFGF y angiogenina²³⁹. Thomopoulos y cols. han demostrado la estrecha relación que existe entre el fenómeno inflamatorio y la angiogénesis. Así, los factores inflamatorios pueden ser inducidos por citoquinas que no son estrictamente pro-inflamatorias. Los factores angiogénicos como el VEGF pueden inducir la formación de vasos en este contexto, que contribuyen a aumentar el flujo sanguíneo en la zona y con él la llegada de más factores proinflamatorios y el edema. Se ha demostrado así mismo, que en

tendinopatía crónica y roturas establecidas se pueden detectar cantidades abundantes de VEGF tanto localmente como en sangre periférica²³⁹. En nuestro modelo experimental, hemos detectado una menor presencia de vasos en los tiempos de sacrificio de 1 día y 1 semana, lo que puede deberse al efecto inmunomodulador de las CMDL. Esta ausencia de vasos no se ha relacionado con una ausencia de cicatrización, ni en nuestro modelo ni en otros en los que se han utilizado CMDL. Así, Ruiz Ibán y cols.¹⁷⁴, realizaron un modelo animal en conejos en el que provocaban roturas del menisco en la región avascular, demostrando mayor tasa de cicatrización en el grupo de roturas agudas en el que aplicaron CMDL. En esta línea de investigación se han desarrollado trabajos en los que se ha aplicado plasma rico en plaquetas o sus derivados, incluso en humanos, en roturas crónicas de manguito rotador como en el caso de Zumstein y cols.²⁴⁰. Aunque la vascularización local, analizada mediante ecografía-doppler, aumentó hasta las 6 semanas, a las 12 semanas no encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. Sabemos que la hipervascularización está presente en el momento de la lesión crónica, y ésta estimula la cicatrización creando un tejido fibroso cicatricial como consecuencia del estímulo inflamatorio. Las CMDL son inmunomoduladoras, y su efecto varía en función del tiempo y de la expresión de los factores locales, lo que puede hacer más favorable la regeneración de una entesis nativa por el proceso complejo descrito por Thomopoulos y cols.¹ modificando el entorno de una forma secuencial. Recientemente y en esta línea de investigación, Oh y cols.¹⁶⁴ han demostrado incluso la capacidad de las CMDL para revertir el fenómeno de infiltración grasa en un modelo animal.

Parece, por tanto, que los factores de crecimiento de forma aislada tienen un efecto efímero, y que, como se mencionó anteriormente, las células mesenquimales puedan modificar de forma permanente el entorno haciendo que el efecto sea más duradero.

Así mismo, puede ser que la aplicación de células de forma aislada sea insuficiente y que sea necesario aportar también la señal que pueda inducir la regeneración. El sitio de reparación puede carecer de las señales celulares o moleculares necesarias para inducir la diferenciación adecuada de las células trasplantadas, sugiriendo que las terapias celulares podrían requerir ser combinadas con los factores de crecimiento y diferenciación adecuados para ser efectivos. En ese escenario, las células troncales son material para la regeneración mientras que las señales sirven para estimularlas hacia ese fin. Las líneas de investigación futuras se encaminaran a utilizar la terapia celular modificada genéticamente para obtener los factores de crecimiento y modificar el microambiente de la forma más específica en función el fin perseguido. Por ello, aún sigue siendo preciso profundizar en la fisiopatología de la reparación del manguito rotador a nivel molecular e identificar de forma exacta los procesos responsables de la misma para poder actuar sobre ellos.

VI. CONCLUSIONES

VI. Conclusiones

1. El modelo animal propuesto es reproducible y apropiado para estudiar el proceso de reparación del manguito rotador. Los estudios histológicos y de biomecánica permiten analizar la reparación tendinosa de forma adecuada.
2. Las CMDL son fáciles de aislar y con el vehículo utilizado se mantienen en el lugar de la cicatrización al menos hasta 7 días, lo que se ha comprobado mediante inmunofluorescencia.
3. La aplicación de las CMDL en el modelo de reparación del manguito rotador no mejora las propiedades biomecánicas de la reparación sometidas al ensayo a tracción propuesto.
4. La aplicación de CMDL en el modelo de reparación del manguito rotador, desde un punto de vista histológico, provoca una disminución del patrón de inflamación aguda y subaguda a las 24 horas y a la semana.
5. La aplicación de CMDL en el modelo de reparación del manguito rotador, desde un punto de vista histológico, no modifica la presencia de colágeno ni en cantidad ni en tipo ni en orientación de sus fibras a las 4 semanas.

VII. RESUMEN

VII. Resumen

Las roturas del manguito rotador constituyen una lesión muy prevalente en la sociedad actual con un incremento en su incidencia en los últimos 10 años y que supone un gran coste económico. Se ha demostrado así mismo que la incidencia de re-roturas es muy alta y de forma subsecuente, la cirugía de revisión. Una de las grandes controversias en la cirugía del manguito rotador actualmente es si el fracaso de la sutura condiciona el resultado clínico. Aunque algunos autores defienden que la función y satisfacción del paciente no depende de la integridad de la reparación, más recientemente la mayor parte de los autores defiende que la ausencia de cicatrización constituye un factor pronóstico.

Se ha demostrado que el fracaso de la sutura tendinosa en muchas de las ocasiones no es una re-rotura, sino un fracaso en la cicatrización en la región de inserción hueso-tendón. La mayoría de éstas ocurren entre las 6 y 26 semanas de la cirugía y la mayor parte de los pacientes no relatan un evento traumático. Ante esta situación, en un primer momento se optó por realizar modificaciones técnicas en cuanto al tipo de sutura, el tipo de nudo o el diseño de los anclajes. Estas innovaciones han obtenido resultados controvertidos. En un segundo lugar, los esfuerzos se han centrado en intentar mejorar la biología de la reparación para favorecer la regeneración de la entesis.

Las células troncales mesenquimales han sido ampliamente utilizadas en numerosos modelos en el sistema músculo-esquelético, incluyendo defectos óseos y cartilaginosos, lesiones meniscales o lesiones de ligamento cruzado anterior. En el modelo del manguito rotador, las MSC han sido utilizadas por grupos de investigación con resultados variables. Las CMDL, un tipo de MSC, han demostrado

capacidad hipoinmunogénica y capacidad de diferenciación en numerosas estirpes celulares. Además han demostrado ser capaces de estimular la cicatrización en modelos de fístulas rectovaginales y perianales, de tendón de Aquiles o en modelos vasculares. El objetivo de este estudio es evaluar la influencia de la aplicación de CMDL en un modelo animal de rotura de manguito rotador, mediante la cuantificación de las propiedades biomecánicas e histológicas de la región de reparación.

Se emplearon 50 ratas Sprague-Dawley con un peso que oscilaba entre 280 y 330 gr y una edad de 8 semanas. De ellas, 32 se destinaron al estudio biomecánico y 18 al estudio histológico. Los animales fueron aleatorizados en dos grupos de cirugía para el estudio biomecánico y en tres para el estudio histológico. La cirugía consistió en una desinserción del tendón supraespinoso de la rata (unilateral para el estudio biomecánico y bilateral para el histológico) que fue suturado en el mismo acto quirúrgico de forma transósea mediante una sutura monofilamento no absorbible. Como coadyuvante a esta sutura, en uno de los grupos se realizó aporte de 2×10^6 CMDL utilizando un soporte de esponja de colágeno y en otro de los grupos aporte del vehículo de colágeno de forma aislada. Para el grupo de histología se incluyó un grupo en el que se realizó únicamente sutura del tendón con fines comparativos. Las CMDL fueron obtenidas del tejido graso abdominal de dos ratas, mediante el proceso establecido por el laboratorio de terapia celular. Para su aislamiento se realiza una disgregación mecánica y enzimática. Una vez aisladas se realiza un cultivo in vitro y una expansión de las mismas. Después son caracterizadas mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo y criopreservadas hasta su utilización. Finalmente, en las CMDL de dos de los animales se realizó marcaje con un inmunotrazador citoplasmático Dil para demostrar su presencia en las muestras

tratadas. El sacrificio se realizó a las 2 y 4 semanas de la cirugía para el grupo del estudio biomecánico y a las 24 horas, 1 semana y 4 semanas para el histológico.

El estudio biomecánico consistió en un ensayo a tracción realizado mediante una presa electromecánica. Se utilizó una precarga de 0,1 N y la velocidad fue de 14 micras/seg. Las variables medidas fueron carga de rotura(N), carga elástica(N), deformación mecánica (mm), rigidez (N/mm²) y energía absorbida (J). Para el estudio histológico, se realizaron técnicas morfométricas (Hematoxilina-Eosina, Tricrómico de Masson , Verhoff-Van Gieson y Orceína y Rojo Sirio) y técnicas inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia.

Los datos recogidos fueron analizados mediante el programa estadístico *Statistical Package for Social Sciences* versión 11,5 (SPSS, Chicago, IL). Se realizó un estudio descriptivo de las variables cuantitativas continuas y discontinuas. Las comparaciones entre las variables cuantitativas continuas se realizaron mediante test no paramétricos (U de Mann- Whitney). Para las variables cuantitativas discontinuas se utilizaron el test de Pearson (Chi cuadrado) y el test exacto de Fisher. El nivel de significación se estableció para valores de $p < 0,05$.

La finalidad de este trabajo es evaluar las propiedades biomecánicas y características histológicas de la región de reparación de la entesis del tendón supraespinoso en un modelo experimental de rotura de manguito rotador tras aportar células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo utilizando como soporte una esponja de colágeno.

Respecto al estudio biomecánico no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para ninguna de las variables estudiadas para ninguno de los tiempos de sacrificio. A las dos semanas, la *carga de rotura* fue de 14,05 N (DE 4,11) para el

grupo control y 15,63 N (DE 4,77) para el grupo con aporte de CMDL ($p=0,23$). A las cuatro semanas, la *carga de rotura* fue de 18,68 N (DE 3,49) para el grupo control y 18,76 N (DE 3,55) para el grupo con aporte de CMDL ($p=1$). Al comparar la *carga de rotura* para el grupo control entre los animales sacrificados a las 2 semanas y a las 4 semanas, los resultados demostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,04$). No ocurrió así al comparar los valores a las 2 y 4 semanas en el grupo con CMDL ($p=0,17$). La *deformación mecánica* a las dos semanas fue 3,07 mm (DE 1,03) en el grupo control y 3,79 mm (DE 1,55) en el grupo CMDL ($p=0,09$) y la *energía absorbida* fue 3,39 J (DE 2,33) para el grupo y 7,42 J (DE 4,23), siendo sus diferencias no significativas ($p=0,06$). A las 4 semanas, la *deformación mecánica* fue 3,89 mm (DE 3,52) en el grupo control y 6,37 mm (DE 3,52) en el grupo CMDL ($p=0,1$) y la *energía absorbida* fue 5,34J (DE 3,37) para el grupo control y 12,66J (DE 8,86) para el grupo con CMDL ($p=0,18$).

Respecto al estudio histológico, a las 24 horas y una semana se apreciaba un patrón de inflamación menos agudo, con menor presencia de vasos, edema y neutrófilos. No se apreciaron diferencias en la cantidad, tipo de colágeno y orientación de las fibras de colágeno para ninguno de los tiempos de sacrificio. En el grupo con aporte de CMDL la aparición de colágeno estaba retrasada, de tal forma que sólo podía apreciarse en las muestras correspondientes a las 4 semanas de sacrificio.

Las reparaciones del manguito rotador fracasan de forma frecuente debido a que la estructura compleja de la entesis nativa no se regenera en el proceso de cicatrización. En un intento de favorecer la biología de la reparación, numerosos tratamientos han sido propuestos, sin haber encontrado aún una solución a este problema. En nuestro estudio, la aplicación de CMDL en un modelo de rotura de tendón supraespinoso en ratas no ha demostrado mejorar las propiedades biomecánicas de la zona de

reparación. La energía absorbida a las 2 y a las 4 semanas fue mayor para el grupo en el que se aplicaron CMDL así como la deformación mecánica. Aunque estas diferencias no fueron significativas, los valores podrían tener relevancia cuando los relacionamos con los hallazgos histológicos. Hemos encontrado un patrón menos agresivo de inflamación aguda en el grupo con CMDL con menor presencia de edema, vasos y PMN. No encontramos diferencias en la cantidad, tipo u orientación de las fibras de colágeno, sin embargo, la presencia de colágeno tipo I y III fue detectable en el grupo de CMDL únicamente en el grupo sacrificado a las 4 semanas. Parece por tanto, que la aplicación de CMDL podría modificar el patrón inflamatorio, retrasando la cicatrización y condicionando la presencia de un tejido más elástico, capaz de deformarse más antes del fracaso mecánico, y precisando una mayor cantidad de energía para ello.

Estos resultados son esperanzadores, pero es necesario un conocimiento más profundo de los mecanismos moleculares que condicionan la cicatrización del manguito rotador para poder actuar específicamente sobre ellos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. Bibliografía

1. Thomopoulos S, Genin GM, Galatz LM. The development and morphogenesis of the tendon-to-bone insertion - what development can teach us about healing -. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2010, Mar;10(1):35-45.
2. Neer CS. Anterior acromioplasty for the chronic impingement syndrome in the shoulder: A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 1972, Jan;54(1):41-50.
3. Keener JD, Wei AS, Kim HM, Paxton ES, Teefey SA, Galatz LM, Yamaguchi K. Revision arthroscopic rotator cuff repair: Repair integrity and clinical outcome. *J Bone Joint Surg Am* 2010, Mar;92(3):590-8.
4. Freedman L, Munro RR. Abduction of the arm in the scapular plane: Scapular and glenohumeral movements. A roentgenographic study. *J Bone Joint Surg Am* 1966, Dec;48(8):1503-10.
5. Clark JM, Harryman DT. Tendons, ligaments, and capsule of the rotator cuff. Gross and microscopic anatomy. *J Bone Joint Surg Am* 1992, Jun;74(5):713-25.
6. Dugas JR, Campbell DA, Warren RF, Robie BH, Millett PJ. Anatomy and dimensions of rotator cuff insertions. *J Shoulder Elbow Surg* 2002;11(5):498-503.
7. Mochizuki T, Sugaya H, Uomizu M, Maeda K, Matsuki K, Sekiya I, et al. Humeral insertion of the supraspinatus and infraspinatus. New anatomical findings regarding the footprint of the rotator cuff. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 2009, Mar 1;91 Suppl 2 Pt 1:1-7.
8. Curtis AS, Burbank KM, Tierney JJ, Scheller AD, Curran AR. The insertional footprint of the rotator cuff: An anatomic study. *Arthroscopy* 2006, Jun;22(6):609.e1.
9. Ball CM, Steger T, Galatz LM, Yamaguchi K. The posterior branch of the axillary nerve: An anatomic study. *J Bone Joint Surg Am* 2003, Aug;85-A(8):1497-501.
10. Ruotolo C, Fow JE, Nottage WM. The supraspinatus footprint: An anatomic study of the supraspinatus insertion. *Arthroscopy* 2004, Mar;20(3):246-9.

11. Mochizuki T, Sugaya H, Uomizu M, Maeda K, Matsuki K, Sekiya I, et al. Humeral insertion of the supraspinatus and infraspinatus. New anatomical findings regarding the footprint of the rotator cuff. Surgical technique. J Bone Joint Surg Am 2009, Mar 1;91 Suppl 2 Pt 1:1-7.
12. Mochizuki T, Sugaya H, Uomizu M, Maeda K, Matsuki K, Sekiya I, et al. The insertional footprint of the rotator cuff: An anatomic study. Arthroscopy 2008, May;90(5):962-9.
13. Moseley HF, Goldie I. The arterial pattern of the rotator cuff of the shoulder. J Bone Joint Surg Br 1963, Nov;45:780-9.
14. Chansky HA, Iannotti JP. The vascularity of the rotator cuff. Clin Sports Med 1991, Oct;10(4):807-22.
15. Rothman RH, Parke WW. The vascular anatomy of the rotator cuff. Clin Orthop Relat Res 1965;41:176-86.
16. Nixon JE, DiStefano V. Ruptures of the rotator cuff. Orthop Clin North Am 1975, Apr;6(2):423-47.
17. Labriola JE, Lee TQ, Debski RE, McMahon PJ. Stability and instability of the glenohumeral joint: The role of shoulder muscles. J Shoulder Elbow Surg 2005;14(1 Suppl S):32S-8S.
18. Parsons IM, Apreleva M, Fu FH, Woo SL. The effect of rotator cuff tears on reaction forces at the glenohumeral joint. J Orthop Res 2002, May;20(3):439-46.
19. Poppen NK, Walker PS. Forces at the glenohumeral joint in abduction. Clin Orthop Relat Res 1978, Sep(135):165-70.
20. Itoi E, Berglund LJ, Grabowski JJ, Schultz FM, Growney ES, Morrey BF, An KN. Tensile properties of the supraspinatus tendon. J Orthop Res 1995, Jul;13(4):578-84.
21. Kim HM, Dahiya N, Teefey SA, Middleton WD, Stobbs G, Steger-May K, et al. Location and initiation of degenerative rotator cuff tears: An analysis of three hundred and sixty shoulders. J Bone Joint Surg Am 2010, May;92(5):1088-96.

22. Nové-Josserand L, Boulahia A, Levigne C, Noel E, Walch G. [Coraco-humeral space and rotator cuff tears]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 1999, Nov;85(7):677-83.
23. Bigliani LU. The morphology of the acromion and its relationship to rotator cuff tears. *Orthop. Trans* 1986;10:228.
24. Uhthoff HK, Hammond DI, Sarkar K, Hooper GJ, Papoff WJ. The role of the coracoacromial ligament in the impingement syndrome. A clinical, radiological and histological study. *Int Orthop* 1988;12(2):97-104.
25. Hamid N, Omid R, Yamaguchi K, Steger-May K, Stobbs G, Keener JD. Relationship of radiographic acromial characteristics and rotator cuff disease: A prospective investigation of clinical, radiographic, and sonographic findings. *J Shoulder Elbow Surg* 2012, Oct;21(10):1289-98.
26. Yamamoto A, Takagishi K, Osawa T, Yanagawa T, Nakajima D, Shitara H, Kobayashi T. Prevalence and risk factors of a rotator cuff tear in the general population. *J Shoulder Elbow Surg* 2010, Jan;19(1):116-20.
27. Tashjian RZ. Epidemiology, natural history, and indications for treatment of rotator cuff tears. *Clin Sports Med* 2012, Oct;31(4):589-604.
28. Carbone S, Gumina S, Arceri V, Campagna V, Fagnani C, Postacchini F. The impact of preoperative smoking habit on rotator cuff tear: Cigarette smoking influences rotator cuff tear sizes. *J Shoulder Elbow Surg* 2012, Jan;21(1):56-60.
29. Oh JH, Jun BJ, McGarry MH, Lee TQ. Does a critical rotator cuff tear stage exist?: A biomechanical study of rotator cuff tear progression in human cadaver shoulders. *J Bone Joint Surg Am* 2011, Nov 16;93(22):2100-9.
30. Kim HM, Dahiya N, Teefey SA, Middleton WD, Stobbs G, Steger-May K, et al. Location and initiation of degenerative rotator cuff tears: An analysis of three hundred and sixty shoulders. *J Bone Joint Surg Am* 2010, May;92(5):1088-96.
31. Jensen KL, Williams GR, Russell IJ, Rockwood CA. Rotator cuff tear arthropathy. *J Bone Joint Surg Am* 1999, Sep;81(9):1312-24.

32. Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL. Tendon degeneration and chronic shoulder pain: Changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis* 1994, Jun;53(6):359-66.
33. Goutallier D, Postel JM, Gleyze P, Leguilloux P, Van Driessche S. Influence of cuff muscle fatty degeneration on anatomic and functional outcomes after simple suture of full-thickness tears. *J Shoulder Elbow Surg* 2003;12(6):550-4.
34. Cofield RH. Subscapular muscle transposition for repair of chronic rotator cuff tears. *Surg Gynecol Obstet* 1982, May;154(5):667-72.
35. Patte D. Classification of rotator cuff lesions. *Clin Orthop Relat Res* 1990, May(254):81-6.
36. Snyder SJ, Pachelli AF, Del Pizzo W, Friedman MJ, Ferkel RD, Pattee G. Partial thickness rotator cuff tears: Results of arthroscopic treatment. *Arthroscopy* 1991;7(1):1-7.
37. Davidson J, Burkhart SS. The geometric classification of rotator cuff tears: A system linking tear pattern to treatment and prognosis. *Arthroscopy* 2010, Mar;26(3):417-24.
38. Snyder SJ. Evaluation and treatment of the rotator cuff. *Orthop Clin North Am* 1993, Jan;24(1):173-92.
39. Nakajima D1, Yamamoto A, Kobayashi T, Osawa T, Shitara H, Ichinose T, Takasawa E, Takagishi K. The effects of rotator cuff tears, including shoulders without pain, on activities of daily living in the general population. *J Orthop Sci* 2012, Mar; 17(2):136-40.
40. DePalma AF. The classic. Surgical anatomy of the rotator cuff and the natural history of degenerative periarthrititis. *Surg clin north am.* 1963;43:1507-1520. *Clin Orthop Relat Res* 2008, Mar;466(3):543-51.
41. Yamaguchi K, Ditsios K, Middleton WD, Hildebolt CF, Galatz LM, Teefey SA. The demographic and morphological features of rotator cuff disease. A comparison of asymptomatic and symptomatic shoulders. *J Bone Joint Surg Am* 2006, Aug;88(8):1699-704.

42. Mikolczyk DK, Wei AS, Tonino P, Marra G, Williams DA, Himes RD, et al. Effect of corticosteroids on the biomechanical strength of rat rotator cuff tendon. *J Bone Joint Surg Am* 2009, May;91(5):1172-80.
43. Duralde XA, Greene RT. Mini-open rotator cuff repair via an anterosuperior approach. *J Shoulder Elbow Surg* 2008;17(5):715-21.
44. Wasilewski SA, Frankl U. Rotator cuff pathology. Arthroscopic assessment and treatment. *Clin Orthop Relat Res* 1991, Jun(267):65-70.
45. Park MC, ElAttrache NS, Tibone JE, Ahmad CS, Jun BJ, Lee TQ. Part I: Footprint contact characteristics for a transosseous-equivalent rotator cuff repair technique compared with a double-row repair technique. *J Shoulder Elbow Surg* 2007;16(4):461-8.
46. Ahmad CS, Stewart AM, Izquierdo R, Bigliani LU. Tendon-bone interface motion in transosseous suture and suture anchor rotator cuff repair techniques. *Am J Sports Med* 2005, Nov;33(11):1667-71.
47. Conti M, Garofalo R, Delle Rose G, Massazza G, Vinci E, Randelli M, Castagna A. Post-operative rehabilitation after surgical repair of the rotator cuff. *Chir Organi Mov* 2009, Apr;93 Suppl 1:S55-63.
48. Keener JD, Galatz LM, Stobbs-Cucchi G, Patton R, Yamaguchi K. Rehabilitation following arthroscopic rotator cuff repair: A prospective randomized trial of immobilization compared with early motion. *J Bone Joint Surg Am* 2014, Jan 1;96(1):11-9.
49. Watson EM, Sonnabend DH. Outcome of rotator cuff repair. *J Shoulder Elbow Surg* 2002;11(3):201-11.
50. Iannotti JP. Full-Thickness rotator cuff tears: Factors affecting surgical outcome. *J Am Acad Orthop Surg* 1994, Mar;2(2):87-95.
51. Gartsman GM, Khan M, Hammerman SM. Arthroscopic repair of full-thickness tears of the rotator cuff. *J Bone Joint Surg Am* 1998, Jun;80(6):832-40.

52. Harryman DT, Mack LA, Wang KY, Jackins SE, Richardson ML, Matsen FA. Repairs of the rotator cuff. Correlation of functional results with integrity of the cuff. *J Bone Joint Surg Am* 1991, Aug;73(7):982-9.
53. Melis B, DeFranco MJ, Chuinard C, Walch G. Natural history of fatty infiltration and atrophy of the supraspinatus muscle in rotator cuff tears. *Clin Orthop Relat Res* 2010, Jun;468(6):1498-505.
54. Jo CH, Shin JS. Changes in appearance of fatty infiltration and muscle atrophy of rotator cuff muscles on magnetic resonance imaging after rotator cuff repair: Establishing new time-zero traits. *Arthroscopy* 2013, Mar;29(3):449-58.
55. Gerber C, Fuchs B, Hodler J. The results of repair of massive tears of the rotator cuff. *J Bone Joint Surg Am* 2000, Apr;82(4):505-15.
56. Cummins CA, Murrell GA. Mode of failure for rotator cuff repair with suture anchors identified at revision surgery. *J Shoulder Elbow Surg* 2003;12(2):128-33.
57. Keener JD, Wei AS, Kim HM, Paxton ES, Teefey SA, Galatz LM, Yamaguchi K. Revision arthroscopic rotator cuff repair: Repair integrity and clinical outcome. *J Bone Joint Surg Am* 2010, Mar;92(3):590-8.
58. Cheung EV, Silverio L, Sperling JW. Strategies in biologic augmentation of rotator cuff repair: A review. *Clin Orthop Relat Res* 2010, Jun;468(6):1476-84.
59. Jost B, Pfirrmann CW, Gerber C, Switzerland Z. Clinical outcome after structural failure of rotator cuff repairs. *J Bone Joint Surg Am* 2000, Mar;82(3):304-14.
60. Djurasovic M, Marra G, Arroyo JS, Pollock RG, Flatow EL, Bigliani LU. Revision rotator cuff repair: Factors influencing results. *J Bone Joint Surg Am* 2001, Dec;83-A(12):1849-55.
61. Grasso A, Milano G, Salvatore M, Falcone G, Deriu L, Fabbriani C. Single-row versus double-row arthroscopic rotator cuff repair: A prospective randomized clinical study. *Arthroscopy* 2009, Jan;25(1):4-12.
62. Burkhart SS. The deadman theory of suture anchors: Observations along a South Texas fence line. *Arthroscopy* 1995;11:119-123.

63. Milano G, Grasso A, Salvatore M, Saccomanno MF, Deriu L, Fabbriani C. Arthroscopic rotator cuff repair with metal and biodegradable suture anchors: A prospective randomized study. *Arthroscopy* 2010, Sep;26(9 Suppl):S112-9.
64. Barber FA, Herbert MA, Schroeder FA, Aziz-Jacobo J, Mays MM, Rapley JH. Biomechanical advantages of triple-loaded suture anchors compared with double-row rotator cuff repairs. *Arthroscopy* 2010, Mar;26(3):316-23.
65. Lo IK, Burkhart SS, Chan KC, Athanasiou K. Arthroscopic knots: Determining the optimal balance of loop security and knot security. *Arthroscopy* 2004, May;20(5):489-502.
66. Galatz LM, Sandell LJ, Rothermich SY, Das R, Mastny A, Havlioglu N, et al. Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury. *J Orthop Res* 2006, Mar;24(3):541-50.
67. Lui P, Zhang P, Chan K, Qin L. Biology and augmentation of tendon-bone insertion repair. *J Orthop Surg Res* 2010;5:59.
68. Benjamin M, Toumi H, Ralphs JR, Bydder G, Best TM, Milz S. Where tendons and ligaments meet bone: Attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. *J Anat* 2006, Apr;208(4):471-90.
69. Benjamin M, Kumai T, Milz S, Boszczyk BM, Boszczyk AA, Ralphs JR. The skeletal attachment of tendons--tendon "entheses". *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002, Dec;133(4):931-45.
70. Waggett AD, Ralphs JR, Kwan AP, Woodnutt D, Benjamin M. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human achilles tendon. *Matrix Biol* 1998, Mar;16(8):457-70.
71. Ralphs JR, Benjamin M, Waggett AD, Russell DC, Messner K, Gao J. Regional differences in cell shape and gap junction expression in rat achilles tendon: Relation to fibrocartilage differentiation. *J Anat* 1998, Aug;193 (Pt 2):215-22.
72. Galatz L, Rothermich S, VanderPloeg K, Petersen B, Sandell L, Thomopoulos S. Development of the supraspinatus tendon-to-bone insertion: Localized expression of extracellular matrix and growth factor genes. *J Orthop Res* 2007, Dec;25(12):1621-8.

73. Chen X, Yin Z, Chen JL, Shen WL, Liu HH, Tang QM, et al. Force and scleraxis synergistically promote the commitment of human ES cells derived mscs to tenocytes. *Sci Rep* 2012;2:977.
74. Akiyama H, Kim JE, Nakashima K, Balmes G, Iwai N, Deng JM, et al. Osteochondroprogenitor cells are derived from sox9 expressing precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, Oct 11;102(41):14665-70.
75. Thomopoulos S, Kim HM, Rothermich SY, Biederstadt C, Das R, Galatz LM. Decreased muscle loading delays maturation of the tendon enthesis during postnatal development. *J Orthop Res* 2007, Sep;25(9):1154-63.
76. Mullender MG, Huiskes R. Proposal for the regulatory mechanism of wolff's law. *J Orthop Res* 1995, Jul;13(4):503-12.
77. Gerber C, Schneeberger AG, Perren SM, Nyffeler RW. Experimental rotator cuff repair. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am* 1999, Sep;81(9):1281-90.
78. Kovacevic D, Rodeo SA. Biological augmentation of rotator cuff tendon repair. *Clin Orthop Relat Res* 2008, Mar;466(3):622-33.
79. St Pierre P, Olson EJ, Elliott JJ, O'Hair KC, McKinney LA, Ryan J. Tendon-healing to cortical bone compared with healing to a cancellous trough. A biomechanical and histological evaluation in goats. *J Bone Joint Surg Am* 1995, Dec;77(12):1858-66.
80. Carpenter JE, Thomopoulos S, Flanagan CL, DeBano CM, Soslowsky LJ. Rotator cuff defect healing: A biomechanical and histologic analysis in an animal model. *J Shoulder Elbow Surg* 1998;7(6):599-605.
81. Diaz Heredia J, Ruiz Ibán M. A, Martínez-Botas Mateo; F. Aranda Romero, S. Moros Marco, González-Lizán F, Martin Gamero F.J.P. Respuesta a la lesión del manguito de los rotadores: Variación en la expresión de factores de crecimiento durante las primeras 8 semanas poslesión. Estudio experimental en ratas. *Cuadernos De Artroscopia* 2012, Apr;19(46):31-8.

82. Cowin AJ, Holmes TM, Brosnan P, Ferguson MW. Expression of tgf-beta and its receptors in murine fetal and adult dermal wounds. *Eur J Dermatol* 2001;11(5):424-31.
83. Cohen DB, Kawamura S, Ehteshami JR, Rodeo SA. Indomethacin and celecoxib impair rotator cuff tendon-to-bone healing. *Am J Sports Med* 2006, Mar;34(3):362-9.
84. Thomopoulos S, Harwood FL, Silva MJ, Amiel D, Gelberman RH. Effect of several growth factors on canine flexor tendon fibroblast proliferation and collagen synthesis in vitro. *J Hand Surg Am* 2005, May;30(3):441-7.
85. Ichinose R, Sano H, Kishimoto KN, Sakamoto N, Sato M, Itoi E. Alteration of the material properties of the normal supraspinatus tendon by nicotine treatment in a rat model. *Acta Orthop* 2010, Oct;81(5):634-8.
86. Peltz CD, Dourte LM, Kuntz AF, Sarver JJ, Kim SY, Williams GR, Soslowsky LJ. The effect of postoperative passive motion on rotator cuff healing in a rat model. *J Bone Joint Surg Am* 2009, Oct;91(10):2421-9.
87. Iwata Y, Morihara T, Tachiiri H, Kajikawa Y, Yoshida A, Arai Y, et al. Behavior of host and graft cells in the early remodeling process of rotator cuff defects in a transgenic animal model. *J Shoulder Elbow Surg* 2008;17(1 Suppl):101S-7S.
88. Moore DR, Cain EL, Schwartz ML, Clancy WG. Allograft reconstruction for massive, irreparable rotator cuff tears. *Am J Sports Med* 2006, Mar;34(3):392-6.
89. Cho NS, Yi JW, Rhee YG. Arthroscopic biceps augmentation for avoiding undue tension in repair of massive rotator cuff tears. *Arthroscopy* 2009, Feb;25(2):183-91.
90. Ide J, Kikukawa K, Hirose J, Iyama K, Sakamoto H, Mizuta H. Reconstruction of large rotator-cuff tears with acellular dermal matrix grafts in rats. *J Shoulder Elbow Surg* 2009;18(2):288-95.
91. Zalavras CG, Gardocki R, Huang E, Stevanovic M, Hedman T, Tibone J. Reconstruction of large rotator cuff tendon defects with porcine small intestinal submucosa in an animal model. *J Shoulder Elbow Surg* 2006;15(2):224-31.

92. Xu H, Sandor M, Qi S, Lombardi J, Connor J, McQuillan DJ, Iannotti JP. Implantation of a porcine acellular dermal graft in a primate model of rotator cuff repair. *J Shoulder Elbow Surg* 2012, May;21(5):580-8.
93. Ricchetti ET, Aurora A, Iannotti JP, Derwin KA. Scaffold devices for rotator cuff repair. *J Shoulder Elbow Surg* 2012, Feb;21(2):251-65.
94. Bond JL, Dopirak RM, Higgins J, Burns J, Snyder SJ. Arthroscopic replacement of massive, irreparable rotator cuff tears using a graftjacket allograft: Technique and preliminary results. *Arthroscopy* 2008, Apr;24(4):403-409.e1.
95. Iannotti JP, Codsi MJ, Kwon YW, Derwin K, Ciccone J, Brems JJ. Porcine small intestine submucosa augmentation of surgical repair of chronic two-tendon rotator cuff tears. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am* 2006, Jun;88(6):1238-44.
96. Beitzel K, McCarthy MB, Cote MP, Russell RP, Apostolakis J, Ramos DM, et al. Properties of biologic scaffolds and their response to mesenchymal stem cells. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 2014, Mar;30(3):289-98.
97. Dines JS, Grande DA, Dines DM. Tissue engineering and rotator cuff tendon healing. *J Shoulder Elbow Surg* 2007;16(5 Suppl):S204-7.
98. Xu Y, Murrell GA. The basic science of tendinopathy. *Clin Orthop Relat Res* 2008, Jul;466(7):1528-38.
99. Garofalo R, Cesari E, Vinci E, Castagna A. Role of metalloproteinases in rotator cuff tear. *Sports Med Arthrosc* 2011, Sep;19(3):207-12.
100. Del Buono A, Oliva F, Longo UG, Rodeo SA, Orchard J, Denaro V, Maffulli N. Metalloproteases and rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg* 2012, Feb;21(2):200-8.
101. Castagna A, Cesari E, Garofalo R, Gigante A, Conti M, Markopoulos N, Maffulli N. Matrix metalloproteases and their inhibitors are altered in torn rotator cuff tendons, but also in the macroscopically and histologically intact portion of those tendons. *Muscles Ligaments Tendons J* 2013;3(3):132-8.

102. Bedi A, Fox AJ, Kovacevic D, Deng XH, Warren RF, Rodeo SA. Doxycycline-mediated inhibition of matrix metalloproteinases improves healing after rotator cuff repair. *Am J Sports Med* 2010, Feb;38(2):308-17.
103. Dean BJ, Franklin SL, Carr AJ. A systematic review of the histological and molecular changes in rotator cuff disease. *Bone Joint Res* 2012, Jul;1(7):158-66.
104. Savitskaya YA, Izaguirre A, Sierra L, Perez F, Cruz F, Villalobos E, et al. Effect of angiogenesis-related cytokines on rotator cuff disease: The search for sensitive biomarkers of early tendon degeneration. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord* 2011;4:43-53.
105. Rodeo SA, Potter HG, Kawamura S, Turner AS, Kim HJ, Atkinson BL. Biologic augmentation of rotator cuff tendon-healing with use of a mixture of osteoinductive growth factors. *J Bone Joint Surg Am* 2007, Nov;89(11):2485-97.
106. Kovacevic D, Fox AJ, Bedi A, Ying L, Deng XH, Warren RF, Rodeo SA. Calcium-phosphate matrix with or without $\text{tgf-}\beta 3$ improves tendon-bone healing after rotator cuff repair. *Am J Sports Med* 2011, Apr;39(4):811-9.
107. Chung SW, Song BW, Kim YH, Park KU, Oh JH. Effect of platelet-rich plasma and porcine dermal collagen graft augmentation for rotator cuff healing in a rabbit model. *Am J Sports Med* 2013, Dec;41(12):2909-18.
108. Seeherman HJ, Archambault JM, Rodeo SA, Turner AS, Zekas L, D'Augusta D, et al. RhBMP-12 accelerates healing of rotator cuff repairs in a sheep model. *J Bone Joint Surg Am* 2008, Oct;90(10):2206-19.
109. Murray DH, Kubiak EN, Jazrawi LM, Araghi A, Kummer F, Loebenberg MI, Zuckerman JD. The effect of cartilage-derived morphogenetic protein 2 on initial healing of a rotator cuff defect in a rat model. *J Shoulder Elbow Surg* 2007;16(2):251-4.
110. Chhabra A, Tsou D, Clark RT, Gaschen V, Hunziker EB, Mikic B. GDF-5 deficiency in mice delays achilles tendon healing. *J Orthop Res* 2003, Sep;21(5):826-35.

111. Chaudhury S, Carr AJ. Lessons we can learn from gene expression patterns in rotator cuff tears and tendinopathies. *J Shoulder Elbow Surg* 2012, Feb;21(2):191-9.

112. Randelli PS, Arrigoni P, Cabitza P, Volpi P, Maffulli N. Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair. A pilot study. *Disabil Rehabil* 2008;30(20-22):1584-9.

113. Chahal J, Van Thiel GS, Mall N, Heard W, Bach BR, Cole BJ, et al. The role of platelet-rich plasma in arthroscopic rotator cuff repair: A systematic review with quantitative synthesis. *Arthroscopy* 2012, Nov;28(11):1718-27.

114. Lopez-Vidriero E, Goulding KA, Simon DA, Sanchez M, Johnson DH. The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: Optimizing the healing environment. *Arthroscopy* 2010, Feb;26(2):269-78.

115. Sheth U, Simunovic N, Klein G, Fu F, Einhorn TA, Schemitsch E, et al. Efficacy of autologous platelet-rich plasma use for orthopaedic indications: A meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am* 2012, Feb 15;94(4):298-307.

[UNKNOWN PUBLICATION TYPE for: Sánchez 2013].

117. Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJ, Faloppa F, Belloti JC. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;12:CD010071.

118. Raeissadat SA, Sedighipour L, Rayegani SM, Bahrami MH, Bayat M, Rahimi R. Effect of platelet-rich plasma (PRP) versus autologous whole blood on pain and function improvement in tennis elbow: A randomized clinical trial. *Pain Res Treat* 2014;2014:191525.

119. Ahmad Z, Brooks R, Kang SN, Weaver H, Nunney I, Tytherleigh-Strong G, Rushton N. The effect of platelet-rich plasma on clinical outcomes in lateral epicondylitis. *Arthroscopy* 2013, Nov;29(11):1851-62.

120. Sánchez Márquez JM, Martínez Díez JM, Barco R, Antuña S. Functional results after arthroscopic repair of massive rotator cuff tears; influence of the application platelet-rich plasma combined with fibrin. *Revista Española De Cirugía Ortopédica Y Traumatología (English Edition)* 2011;55(4):282-7.

121. Ruiz-Moneo P, Molano-Muñoz J, Prieto E, Algorta J. Plasma rich in growth factors in arthroscopic rotator cuff repair: A randomized, double-blind, controlled clinical trial. *Arthroscopy* 2013, Jan;29(1):2-9.
122. Sánchez M, Anitua E, Andia I. Poor standardization in platelet-rich therapies hampers advancement. *Arthroscopy* 2010;26(6):725-6.
123. Randelli P, Arrigoni P, Ragone V, Aliprandi A, Cabitza P. Platelet rich plasma in arthroscopic rotator cuff repair: A prospective RCT study, 2-year follow-up. *J Shoulder Elbow Surg* 2011, Jun;20(4):518-28.
124. Gumina S, Campagna V, Ferrazza G, Giannicola G, Fratalocchi F, Milani A, Postacchini F. Use of platelet-leukocyte membrane in arthroscopic repair of large rotator cuff tears: A prospective randomized study. *J Bone Joint Surg Am* 2012, Aug 1;94(15):1345-52.
125. Anitua E, Zalduendo MM, Alkhraisat MH, Orive G. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. *Ann Anat* 2013, Oct;195(5):461-6.
126. Gulotta LV, Kovacevic D, Packer JD, Ehteshami JR, Rodeo SA. Adenoviral-mediated gene transfer of human bone morphogenetic protein-13 does not improve rotator cuff healing in a rat model. *Am J Sports Med* 2011, Jan;39(1):180-7.
127. Pelinkovic D, Lee JY, Engelhardt M, Rodosky M, Cummins J, Fu FH, Huard J. Muscle cell-mediated gene delivery to the rotator cuff. *Tissue Eng* 2003, Feb;9(1):143-51.
128. Isaac C, Gharaibeh B, Witt M, Wright VJ, Huard J. Biologic approaches to enhance rotator cuff healing after injury. *J Shoulder Elbow Surg* 2012, Feb;21(2):181-90.
129. Gulotta LV, Kovacevic D, Packer JD, Deng XH, Rodeo SA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with scleraxis improve rotator cuff healing in a rat model. *Am J Sports Med* 2011, Jun;39(6):1282-9.

130. Gulotta LV, Kovacevic D, Packer JD, Deng XH, Rodeo SA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with scleraxis improve rotator cuff healing in a rat model. *Am J Sports Med* 2011, Jun;39(6):1282-9.
131. Obaid H, Connell D. Cell therapy in tendon disorders: What is the current evidence? *Am J Sports Med* 2010, Oct;38(10):2123-32.
132. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007, May 11;100(9):1249-60.
133. García-Gómez I, Elvira G, Zapata AG, Lamana ML, Ramírez M, Castro JG, et al. Mesenchymal stem cells: Biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther* 2010, Oct;10(10):1453-68.
134. Verfaillie CM. Adult stem cells: Assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 2002, Nov;12(11):502-8.
135. Oreffo RO, Cooper C, Mason C, Clements M. Mesenchymal stem cells: Lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev* 2005;1(2):169-78.
136. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999, Apr 2;284(5411):143-7.
137. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000, Aug;164(2):247-56.
138. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003, May 1;116(Pt 9):1827-35.
139. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002, Apr 4;416(6880):542-5.
140. Watt FM, Hogan BL. Out of eden: Stem cells and their niches. *Science* 2000, Feb 25;287(5457):1427-30.

141. Ju YJ, Muneta T, Yoshimura H, Koga H, Sekiya I. Synovial mesenchymal stem cells accelerate early remodeling of tendon-bone healing. *Cell Tissue Res* 2008, Jun;332(3):469-78.
142. Tamaki T, Uchiyama Y, Akatsuka A. Plasticity and physiological role of stem cells derived from skeletal muscle interstitium: Contribution to muscle fiber hyperplasia and therapeutic use. *Curr Pharm Des* 2010;16(8):956-67.
143. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, García MP, Sáez FJ, Díaz-Flores L, Valladares F, Madrid JF. CD34+ stromal cells/fibroblasts/fibrocytes/telocytes as a tissue reserve and a principal source of mesenchymal cells. Location, morphology, function and role in pathology. *Histol Histopathol* 2014, Feb 3.
144. Ju YJ, Muneta T, Yoshimura H, Koga H, Sekiya I. Synovial mesenchymal stem cells accelerate early remodeling of tendon-bone healing. *Cell Tissue Res* 2008, Jun;332(3):469-78.
145. Zhang Q, Cheng B. Tendon-derived stem cells as a new cell source for tendon tissue engineering. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2013;18:756-64.
146. Peterson B, Zhang J, Iglesias R, Kabo M, Hedrick M, Benhaim P, Lieberman JR. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng* 2005;11(1-2):120-9.
147. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods* 2008, Jun;45(2):115-20.
148. García-Olmo D, García-Arranz M, García LG, Cuellar ES, Blanco IF, Prianes LA, et al. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal crohn's disease: A new cell-based therapy. *Int J Colorectal Dis* 2003, Sep;18(5):451-4.
149. Gimble JM, Bunnell BA, Guilak F. Human adipose-derived cells: An update on the transition to clinical translation. *Regen Med* 2012, Mar;7(2):225-35.
150. Schäffler A, Büchler C. Concise review: Adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007, Apr;25(4):818-27.

151. Ogawa R, Mizuno H, Hyakusoku H, Watanabe A, Migita M, Shimada T. Chondrogenic and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *J Nihon Med Sch* 2004, Aug;71(4):240-1.
152. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007, Nov;213(2):341-7.
153. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002, Dec;13(12):4279-95.
154. Gimble JM, Grayson W, Guilak F, Lopez MJ, Vunjak-Novakovic G. Adipose tissue as a stem cell source for musculoskeletal regeneration. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011;3:69-81.
155. Bacou F, el Andalousi RB, Daussin PA, Micallef JP, Levin JM, Chammas M, et al. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transplant* 2004;13(2):103-11.
156. Jack GS, Almeida FG, Zhang R, Alfonso ZC, Zuk PA, Rodríguez LV. Processed lipoaspirate cells for tissue engineering of the lower urinary tract: Implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction. *J Urol* 2005, Nov;174(5):2041-5.
157. Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, Kresh JY. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003, Jul;126(1):124-32.
158. Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 2003, Aug;3(5):705-13.
159. Brzoska M, Geiger H, Gauer S, Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, Apr 29;330(1):142-50.
160. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, Mar 4;328(1):258-64.

161. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, Mar 24;341(4):1135-40.
162. Kang SK, Shin MJ, Jung JS, Kim YG, Kim CH. Autologous adipose tissue-derived stromal cells for treatment of spinal cord injury. *Stem Cells Dev* 2006, Aug;15(4):583-94.
163. Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: Case report. *J Craniomaxillofac Surg* 2004, Dec;32(6):370-3.
164. Oh JH, Chung SW, Kim SH, Chung JY, Kim JY. 2013 neer award: Effect of the adipose-derived stem cell for the improvement of fatty degeneration and rotator cuff healing in rabbit model. *J Shoulder Elbow Surg* 2013, Oct 12.
165. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: Ten years of research and a literature review. *J Nihon Med Sch* 2009, Apr;76(2):56-66.
166. Mizuno H, Itoi Y, Kawahara S, Ogawa R, Akaishi S, Hyakusoku H. In vivo adipose tissue regeneration by adipose-derived stromal cells isolated from GFP transgenic mice. *Cells Tissues Organs* 2008;187(3):177-85.
167. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2008, Jan;121(1):50-8.
168. Nambu M, Ishihara M, Nakamura S, Mizuno H, Yanagibayashi S, Kanatani Y, et al. Enhanced healing of mitomycin c-treated wounds in rats using inbred adipose tissue-derived stromal cells within an atelocollagen matrix. *Wound Repair Regen* 2007;15(4):505-10.
169. Nambu M, Kishimoto S, Nakamura S, Mizuno H, Yanagibayashi S, Yamamoto N, et al. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. *Ann Plast Surg* 2009, Mar;62(3):317-21.

170. Tobita M, Uysal AC, Ogawa R, Hyakusoku H, Mizuno H. Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 2008, Jun;14(6):945-53.
171. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 2004, May;22(5):560-7.
172. Masuoka K, Asazuma T, Hattori H, Yoshihara Y, Sato M, Matsumura K, et al. Tissue engineering of articular cartilage with autologous cultured adipose tissue-derived stromal cells using atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane sealing in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006, Oct;79(1):25-34.
173. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006, Apr;12(4):459-65.
174. Ruiz-Ibán MÁ, Díaz-Heredia J, García-Gómez I, Gonzalez-Lizán F, Elías-Martín E, Abaira V. The effect of the addition of adipose-derived mesenchymal stem cells to a meniscal repair in the avascular zone: An experimental study in rabbits. *Arthroscopy* 2011, Dec;27(12):1688-96.
175. Schenke-Layland K, Strem BM, Jordan MC, Deemedio MT, Hedrick MH, Roos KP, et al. Adipose tissue-derived cells improve cardiac function following myocardial infarction. *J Surg Res* 2009, May 15;153(2):217-23.
176. Mazo M, Gavira JJ, Pelacho B, Prosper F. Adipose-derived stem cells for myocardial infarction. *J Cardiovasc Transl Res* 2011, Apr;4(2):145-53.
177. Mendel TA, Clabough EB, Kao DS, Demidova-Rice TN, Durham JT, Zotter BC, et al. Pericytes derived from adipose-derived stem cells protect against retinal vasculopathy. *PLoS One* 2013;8(5):e65691.
178. Pilat N, Unger L, Berlakovich GA. Implication for bone marrow derived stem cells in hepatocyte regeneration after orthotopic liver transplantation. *Int J Hepatol* 2013;2013:310612.

179. Dadon-Nachum M, Melamed E, Offen D. Stem cells treatment for sciatic nerve injury. *Expert Opin Biol Ther* 2011, Dec;11(12):1591-7.
180. De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, Arnalich-Montiel F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: Advances and applications. *Curr Mol Med* 2012, Jun;12(5):574-91.
181. Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, Colmenero I, Ramírez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 2006, Nov;24(11):2582-91.
182. Rigotti G, Marchi A, Galiè M, Baroni G, Benati D, Krampera M, et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: A healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2007, Apr 15;119(5):1409-22; discussion 1423-4.
183. Alvarez PD, García-Arranz M, Georgiev-Hristov T, García-Olmo D. A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells. *Thorax* 2008, Apr;63(4):374-6.
184. García-Olmo D, García-Arranz M, García LG, Cuellar ES, Blanco IF, Prianes LA, et al. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal crohn's disease: A new cell-based therapy. *Int J Colorectal Dis* 2003, Sep;18(5):451-4.
185. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther* 2008, Sep;8(9):1417-23.
186. Payo Rodríguez J. Uso de células madre derivadas de la grasa en las roturas agudas del tendón de Aquiles. Estudio experimental en ratas. Tesis doctoral. Universidad autónoma de Madrid. 2010.
187. Lim JK, Hui J, Li L, Thambyah A, Goh J, Lee EH. Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 2004, Nov;20(9):899-910.

188. Gulotta LV, Kovacevic D, Montgomery S, Ehteshami JR, Packer JD, Rodeo SA. Stem cells genetically modified with the developmental gene MT1-MMP improve regeneration of the supraspinatus tendon-to-bone insertion site. *Am J Sports Med* 2010, Jul;38(7):1429-37.
189. Barco Laasko R. ASCs therapy in rotator cuff tear: an animal model. Presentación oral en el congreso de la Sociedad Europea de Cirugía de Hombro y Codo. Lyon. 2011.
190. Ellera Gomes JL, da Silva RC, Silla LM, Abreu MR, Pellanda R. Conventional rotator cuff repair complemented by the aid of mononuclear autologous stem cells. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2012, Feb;20(2):373-7.
191. García-Olmo D, García-Arranz M, García LG, Cuellar ES, Blanco IF, Prianes LA, et al. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal crohn's disease: A new cell-based therapy. *Int J Colorectal Dis* 2003, Sep;18(5):451-4.
192. Thirumala S, Zvonic S, Floyd E, Gimble JM, Devireddy RV. Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells. *Biotechnol Prog* 2005;21(5):1511-24.
193. Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 2005, May 2;201(9):1397-405.
194. Anderson K, Seneviratne AM, Izawa K, Atkinson BL, Potter HG, Rodeo SA. Augmentation of tendon healing in an intraarticular bone tunnel with use of a bone growth factor. *Am J Sports Med* 2001;29(6):689-98.
195. Gulotta LV, Rodeo SA. Growth factors for rotator cuff repair. *Clin Sports Med* 2009, Jan;28(1):13-23.
196. Rodeo SA. Biologic augmentation of rotator cuff tendon repair. *J Shoulder Elbow Surg* 2007;16(5 Suppl):S191-7.

197. Gulotta LV, Kovacevic D, Ehteshami JR, Dagher E, Packer JD, Rodeo SA. Application of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rotator cuff repair model. *Am J Sports Med* 2009, Nov;37(11):2126-33.
198. Carpenter JE, Thomopoulos S, Flanagan CL, DeBano CM, Soslowsky LJ. Rotator cuff defect healing: A biomechanical and histologic analysis in an animal model. *J Shoulder Elbow Surg* 1998;7(6):599-605.
199. Soslowsky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, Banerji I, Moalli MR. Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg* 1996;5(5):383-92.
200. Bedi A, Fox AJ, Kovacevic D, Deng XH, Warren RF, Rodeo SA. Doxycycline-mediated inhibition of matrix metalloproteinases improves healing after rotator cuff repair. *Am J Sports Med* 2010, Feb;38(2):308-17.
201. Soslowsky LJ, Thomopoulos S, Tun S, Flanagan CL, Keefer CC, Mastaw J, Carpenter JE. Neer award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: A histologic and biomechanical study. *J Shoulder Elbow Surg* 2000;9(2):79-84.
202. Derwin KA, Codsì MJ, Milks RA, Baker AR, McCarron JA, Iannotti JP. Rotator cuff repair augmentation in a canine model with use of a woven poly-L-lactide device. *J Bone Joint Surg Am* 2009, May;91(5):1159-71.
203. Kobayashi M, Itoi E, Minagawa H, Miyakoshi N, Takahashi S, Tuoheti Y, et al. Expression of growth factors in the early phase of supraspinatus tendon healing in rabbits. *J Shoulder Elbow Surg* 2006;15(3):371-7.
204. Morton DB. A systematic approach for establishing humane endpoints. *ILAR J* 2000;41(2):80-6.
205. Roach HI, Mehta G, Oreffo RO, Clarke NM, Cooper C. Temporal analysis of rat growth plates: Cessation of growth with age despite presence of a physis. *J Histochem Cytochem* 2003, Mar;51(3):373-83.

206. Nho SJ, Delos D, Yadav H, Pensak M, Romeo AA, Warren RF, MacGillivray JD. Biomechanical and biologic augmentation for the treatment of massive rotator cuff tears. *Am J Sports Med* 2010, Mar;38(3):619-29.
207. Rodeo SA, Suzuki K, Deng XH, Wozney J, Warren RF. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to enhance tendon healing in a bone tunnel. *Am J Sports Med* 1999;27(4):476-88.
208. Gimbel JA, Van Kleunen JP, Mehta S, Perry SM, Williams GR, Soslowsky LJ. Supraspinatus tendon organizational and mechanical properties in a chronic rotator cuff tear animal model. *J Biomech* 2004, May;37(5):739-49.
209. Buchmann S, Walz L, Sandmann GH, Hoppe H, Beitzel K, Wexel G, et al. Rotator cuff changes in a full thickness tear rat model: Verification of the optimal time interval until reconstruction for comparison to the healing process of chronic lesions in humans. *Arch Orthop Trauma Surg* 2011, Mar;131(3):429-35.
210. Killian ML, Cavinatto L, Shah SA, Sato EJ, Ward SR, Havlioglu N, et al. The effects of chronic unloading and gap formation on tendon-to-bone healing in a rat model of massive rotator cuff tears. *J Orthop Res* 2014, Mar;32(3):439-47.
211. Peçanha R, Bagno LL, Ribeiro MB, Robottom Ferreira AB, Moraes MO, Zapata-Sudo G, et al. Adipose-derived stem-cell treatment of skeletal muscle injury. *J Bone Joint Surg Am* 2012, Apr 4;94(7):609-17.
212. Gerber C, Schneeberger AG, Beck M, Schlegel U. Mechanical strength of repairs of the rotator cuff. *J Bone Joint Surg Br* 1994, May;76(3):371-80.
213. Peltz CD, Sarver JJ, Dourte LM, Würgler-Hauri CC, Williams GR, Soslowsky LJ. Exercise following a short immobilization period is detrimental to tendon properties and joint mechanics in a rat rotator cuff injury model. *J Orthop Res* 2010, Jul;28(7):841-5.
214. Gimbel JA, Van Kleunen JP, Williams GR, Thomopoulos S, Soslowsky LJ. Long durations of immobilization in the rat result in enhanced mechanical properties of the healing supraspinatus tendon insertion site. *J Biomech Eng* 2007, Jun;129(3):400-4.

215. Beason DP, Connizzo BK, Dourte LM, Mauck RL, Soslowsky LJ, Steinberg DR, Bernstein J. Fiber-aligned polymer scaffolds for rotator cuff repair in a rat model. *J Shoulder Elbow Surg* 2012, Feb;21(2):245-50.
216. Rodeo SA, Suzuki K, Deng XH, Wozney J, Warren RF. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to enhance tendon healing in a bone tunnel. *Am J Sports Med* 1999;27(4):476-88.
217. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JJ, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell* 2002;13(12):4279.
218. Lenoir N. Europe confronts the embryonic stem cell research challenge. *Science* 2000, Feb 25;287(5457):1425-7.
219. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: An underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006, Apr;24(4):150-4.
220. García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 2005, Jul;48(7):1416-23.
221. Herreros D. Diseño de una nueva terapia con células madre autólogas derivadas de lipoaspirado para el tratamiento de la patología fistulosa. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. 2006.
222. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: A phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 2009, Jan;52(1):79-86.
223. Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005, Apr 15;65(8):3035-9.
224. García S, Bernad A, Martin MC, Cigudosa JC, García-Castro J y de la Fuente R. Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2010, May;316(9): 1648-1650.

225. Ensor KL, Kwon YW, Dibeneditto MR, Zuckerman JD, Rokito AS. The rising incidence of rotator cuff repairs. *J Shoulder Elbow Surg* 2013, Dec;22(12):1628-32.
226. Iyengar JJ, Samagh SP, Schairer W, Singh G, Valone FH, Feeley BT. Current trends in rotator cuff repair: Surgical technique, setting, and cost. *Arthroscopy* 2014, Mar;30(3):284-8.
227. Mladen D, Guido M, Julian S, Roger G, Evan L, Louis U. Revision rotator cuff repair: Factors influencing results. *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)* 2001;83(12):1849-55.
228. Lädermann A, Denard PJ, Burkhart SS. Revision arthroscopic rotator cuff repair: Systematic review and authors' preferred surgical technique. *Arthroscopy* 2012, Aug;28(8):1160-9.
229. Miller BS, Downie BK, Kohen RB, Kijek T, Lesniak B, Jacobson JA, et al. When do rotator cuff repairs fail? Serial ultrasound examination after arthroscopic repair of large and massive rotator cuff tears. *Am J Sports Med* 2011, Oct;39(10):2064-70.
230. Keener JD. Revision rotator cuff repair. *Clin Sports Med* 2012, Oct;31(4):713-25.
231. Slabaugh MA, Nho SJ, Grumet RC, Wilson JB, Seroyer ST, Frank RM, et al. Does the literature confirm superior clinical results in radiographically healed rotator cuffs after rotator cuff repair? *Arthroscopy* 2010, Mar;26(3):393-403.
232. Yoo JH, Cho NS, Rhee YG. Effect of postoperative repair integrity on health-related quality of life after rotator cuff repair: Healed versus retear group. *Am J Sports Med* 2013, Nov;41(11):2637-44.
233. Namdari S, Donegan RP, Chamberlain AM, Galatz LM, Yamaguchi K, Keener JD. Factors affecting outcome after structural failure of repaired rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am* 2014, Jan 15;96(2):99-105.
234. Iannotti JP, Deutsch A, Green A, Rudicel S, Christensen J, Marraffino S, Rodeo S. Time to failure after rotator cuff repair: A prospective imaging study. *J Bone Joint Surg Am* 2013, Jun 5;95(11):965-71.

235. Ide J, Kikukawa K, Hirose J, Iyama K, Sakamoto H, Fujimoto T, Mizuta H. The effect of a local application of fibroblast growth factor-2 on tendon-to-bone remodeling in rats with acute injury and repair of the supraspinatus tendon. *J Shoulder Elbow Surg* 2009;18(3):391-8.
236. Alvarez PD, García-Arranz M, Georgiev-Hristov T, García-Olmo D. A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells. *Thorax* 2008, Apr;63(4):374-6.
237. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007, Nov;213(2):341-7.
238. Brooks CH, Revell WJ, Heatley FW. A quantitative histological study of the vascularity of the rotator cuff tendon. *J Bone Joint Surg Br* 1992, Jan;74(1):151-3.
239. Savitskaya YA, Izaguirre A, Sierra L, Perez F, Cruz F, Villalobos E, et al. Effect of angiogenesis-related cytokines on rotator cuff disease: The search for sensitive biomarkers of early tendon degeneration. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord* 2011;4:43-53.
240. Zumstein MA, Rumian A, Lesbats V, Schaer M, Boileau P. Increased vascularization during early healing after biologic augmentation in repair of chronic rotator cuff tears using autologous leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF): A prospective randomized controlled pilot trial. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery* 2014, Jan;23(1):3-12.